N° d'ordre : 390

N° D'ENREGISTREMENT AU C.N.R.S.

A. O. 5481

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Philippe COMBELAS

Étude par spectrométrie de vibration de la solvatation de polyamides par les solvants donneurs de proton. Application aux polyacrylamides et polypeptides.

Soutenue le 30 mars 1973, devant la Commission d'Examen :

M. A. PACAULT, Membre correspondant de l'Institut, Professeur ..... *Président.*

M^lle^ M.-L. JOSIEN, Professeur à l'Université de Paris VI

M. J. NEEL, Professeur à l'Université de Nancy ..... *Examinateurs*

M. J. LASCOMBE, Professeur .....

M^lle^ C. GARRIGOU-LAGRANGE, Maître de Recherche ...

— 1973 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547309_0005

N° d'ordre : 390

N° D'ENREGISTREMENT AU C.N.R.S.
A. O. 5481

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Philippe COMBELAS

Étude par spectrométrie de vibration de la solvatation de polyamides par les solvants donneurs de proton. Application aux polyacrylamides et polypeptides.

Soutenue le 30 mars 1973, devant la Commission d'Examen :

M. A. PACAULT, Membre correspondant de l'Institut, Professeur ..... *Président.*

M^lle^ M.-L. JOSIEN, Professeur à l'Université de Paris VI
M. J. NEEL, Professeur à l'Université de Nancy .....
M. J. LASCOMBE, Professeur .....
M^lle^ C. GARRIGOU-LAGRANGE, Maître de Recherche ... } *Examinateurs*

— 1973 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma femme,
A mon fils,

A mes parents,
A mes beaux-parents.

Une grande partie de cette étude a été réalisée au Centre de Recherches Paul Pascal que dirige Monsieur le Professeur PACAULT, membre correspondant de l'Institut. Je le prie de trouver ici l'expression de ma très sincère gratitude pour m'avoir fait l'honneur de m'accepter parmi ses chercheurs et de présider mon jury de thèse.

Je suis heureux d'exprimer ma très profonde reconnaissance ainsi que mon attachement à Monsieur le Professeur LASCOMBE qui m'a proposé le sujet de ce travail et qui a bien voulu m'accueillir initialement dans son laboratoire. Tout au long de ces années, il m'a constamment fait bénéficier de son appui chaleureux et a largement contribué à l'avancement de mes recherches par des discussions toujours très fructueuses au cours desquelles j'ai pu apprécier sa grande ouverture scientifique.

Mademoiselle JOSIEN, Professeur à l'Université de Paris VI, m'a permis de poursuivre mes travaux pendant une année dans son groupe de recherche. Elle m'a toujours accordé son appui bienveillant et ses encouragements. En outre, elle a accepté d'être mon parrain au C.N.R.S. et de venir juger ce travail. Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de ma très respectueuse reconnaissance.

Mademoiselle GARRIGOU-LAGRANGE, Maître de Recherches au C.N.R.S., a plus spécialement suivi le déroulement des études effectuées sur les composés peptidiques. Je lui adresse mes plus vifs remerciements pour le soutien constant et amical qu'elle m'a apporté en toutes circonstances.

Je remercie très chaleureusement Madame REY, Chargée de Recherches au C.N.R.S., Monsieur QUIVORON, Professeur à l'Université de Paris VI et Monsieur CRUEGE, Ingénieur de Recherches au C.N.R.S.,avec lesquels j'ai plus particulièrement travaillé lors des recherches menées sur les polyacrylamides.

Je sais gré à Monsieur NEEL, Professeur à l'Université de Nancy et responsable de la RCP 195, de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail à travers d'intéressantes discussions. Je lui suis également très reconnaissant d'avoir bien voulu accepter de participer à mon jury de thèse.

Je ne saurais oublier que cette étude a été effectuée dans le cadre des recherches coopératives sur programme relatives à la détermination des structures moléculaires de composés d'intérêt biologique (RCP 195). J'ai pu ainsi bénéficier de l'étroite et amicale collaboration avec les chercheurs des différents laboratoires et en particulier je remercie très vivement Mesdames MARCHAL et FOUGNOT, Messieurs SEBILLE, MARRAUD et HEITZ qui ont grandement facilité mes travaux en me fournissant des produits et en réalisant certaines expériences.

Tout au long de mes travaux de thèse j'ai toujours trouvé une aide amicale auprès des chercheurs et techniciens du Centre de Recherches Paul Pascal, du Laboratoire de Spectroscopie Infrarouge et du Laboratoire de Spectrochimie Moléculaire. Je remercie en particulier bien amicalement Mademoiselle BIES et Monsieur MOINEAU pour le soin et la diligence qu'ils ont apportés à la réalisation technique de ce mémoire.

ETUDE PAR SPECTROMETRIE DE VIBRATION DE LA SOLVATATION DE POLYAMIDES PAR LES SOLVANTS DONNEURS DE PROTON. APPLICATION AUX POLYACRYLAMIDES ET POLYPEPTIDES

S O M M A I R E

PAGES

INTRODUCTION..... 1

PREMIERE PARTIE

ETUDE DE LA SOLVATATION D'UN POLYACRYLAMIDE PAR LES SOLVANTS DONNEURS DE PROTON. COMPARAISON DE SA BASICITE ET DE CELLE D'AMIDES N-DISUBSTITUES MODELES..... 5

INTRODUCTION..... 7

CHAPITRE I: ETUDE DE LA BASICITE COMPAREE DU POLYACRYLOPIPERIDIDE ET DES AMIDES MODELES FIGURANT SA SEQUENCE 11

1.1.1. Etude des mélanges binaires amide-solvant et polyacrylopipéridide - solvant..... 12

1.1.2. Etude des mélanges ternaires amide (ou polyacrylopipéridide)- solvant donneur de proton - solvant inerte..... 15

1.1.2.1. Interactions amides - alcools..... 17

1.1.2.2. Interactions amides - halogénoformes..... 19

1.1.3. Détermination des grandeurs thermodynamiques caractérisant l'association des accepteurs d'électrons avec le polyacrylopipéridide et ses molécules modèles..... 20

1.1.3.1. Principe de la détermination..... 20

1.1.3.2. Résultats..... 23

1.1.4. Discussion..... 26

CHAPITRE II : ETUDE DES INTERACTIONS AMIDE (ET POLYAMIDE) - ACIDES CARBOXYLIQUES. LIAISON HYDROGENE ET PROTONATION..... 27

1.2.1. Rappels sur le phénomène de protonation des amides..... 27

1.2.2. Interactions amides - acides carboxyliques..... 29

1.2.2.1. Cas de l'acide acétique..... 29

1.2.2.2. Cas des acides trichloro - et trifluoroacétiques..... 33

1.2.3. Interactions polyacrylamide - acides carboxyliques..... 37

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE..... 41

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA SOLVATATION DES POLYPEPTIDES PAR LES SOLVANTS DONNEURS DE PROTON AU COURS DE LEUR TRANSFORMATION DE CONFORMATION HELICE-CHAINE STATISTIQUE..... 43

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES POLYPEPTIDES EN SOLUTION..... 45

2.1.1. Conformation des polypeptides en solution..... 45

2.1.2. Techniques physico-chimiques d'étude de la conformation des polypeptides en solution..... 47

2.1.3. La transformation hélice α - chaîne statistique. 49

2.1.4. Rappels thermodynamiques sur le phénomène de transition hélice - pelote..... 50

2.1.5. Résultats expérimentaux concernant le mode d'interaction polypeptide - acide..... 56

2.1.6. Intérêt d'une étude, par spectroscopie infrarouge, de la transformation hélice - pelote..... 56

CHAPITRE II : ANALYSE DU MODE D'INTERACTION POLYPEPTIDE - ACIDE PROVOQUANT LA TRANSITION HELICE - PELOTE DU POLYMERE : ETUDE COMPARATIVE DE LA POLY - L - ALANINE ET D'UN AMIDE MODELE EN SOLUTION DANS DES MELANGES ACIDE TRIFLUOROACETIQUE - CHLOROFORME.... 61

2.2.1. Etude d'un amide modèle : le N-méthylacétamide.. 63

2.2.1.1. Cas des solutions diluées en acide.... 63

2.2.1.2. Cas des solutions concentrées en acide 65

2.2.2. Etude de la poly - L - alanine..... 69
2.2.2.1. Mise en évidence et analyse de l'interaction polymère-acide..... 69
2.2.2.2. Discussion des travaux antérieurs.... 73
2.2.2.3. Comparaison entre les résultats spectroscopiques et l'allure de la transition hélice-pelote de la poly - L - alanine..... 75

CHAPITRE III : ETUDE DE LA TRANSFORMATION HELICE - CHAINE STATISTIQUE DE QUELQUES POLYPEPTIDES A CHAINES LATERALES POLAIRES..... 81

2.3.1. Présentation des polymères étudiés..... 81
2.3.2. Mise en évidence des caractéristiques spectroscopiques de la transition coopérative par l'analyse des bandes amide..... 88
2.3.2.1. Cas des solutions dans le chloroforme pur : structures hélicoïdales..... 88
2.3.2.2. Cas des solutions acides : transition hélice - pelote..... 89
2.3.3. Tentative de mesure du taux de complexation polypeptide - acide avant la transition..... 91
2.3.4. Influence de la masse des échantillons sur l'allure de la transition..... 95
2.3.5. Etude du comportement des chaînes latérales au cours de la transition par l'analyse des bandes $\nu(C=O)$ ester..... 96
2.3.6. Discussion de la théorie de la transition..... 102

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA CONFORMATION DES POLYPEPTIDES EN MILIEU ALCOOLIQUE..... 105
2.4.1. Etude de la poly - L - alanine..... 105
2.4.2. Etude des polypeptides à chaînes latérales polaires..... 107

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE..... 115

CONCLUSION GENERALE..... 119

CONDITIONS EXPERIMENTALES..... 125

BIBLIOGRAPHIE..... 129

I N T R O D U C T I O N

L'étude physicochimique des substances macromoléculaires en solution, et en particulier la détermination de leur conformation, doit être faite en tenant compte des propriétés du milieu environnant. Ceci est d'autant plus net que des interactions polymère - solvant sont susceptibles de s'établir et d'entrer en compétition avec les forces intramoléculaires existant au sein des chaînes. La conformation alors adoptée par la macromolécule est une propriété d'équilibre entre les deux types de forces dont la nature et les caractéristiques doivent, par conséquent, être analysées avec précision.

Parmi les diverses catégories de forces intra - ou intermoléculaires qui peuvent participer à la cohésion de l'édifice macromoléculaire, la liaison hydrogène joue un rôle essentiel. Elle intervient, par exemple, de façon prépondérante dans les structures d'un nombre important de composés biologiques. Son existence est liée à la présence, dans le motif de répétition du polymère, de groupements accepteurs et (ou) donneurs de proton. Lorsque les deux types de sites sont présents, le polymère a les propriétés d'un polyampholyte généralisé, capable en particulier d'autoassociation. Si, par contre, le polymère ne possède qu'un seul type de fonction acceptrice de proton, c'est une polybase de Lewis ou polybase généralisée incapable de s'autoassocier par liaison hydrogène.

La détermination expérimentale des interactions polymère - solvant est généralement faite à l'aide des méthodes physico-chimiques globales (osmométrie,diffusion de la lumière, viscosimétrie etc...). Ces procédés présentent le désavantage de conduire à des résultats qui ne peuvent être interprétés qu'à une échelle macroscopique et ne permettent pas de préciser le phénomène de solvatation au voisinage de chaque site macromoléculaire. Par contre, la spectroscopie infrarouge donne des renseignements directs sur les liaisons hydrogène ; elle peut donc être utilisée pour aborder ces problèmes dans les cas favorables où les modes de vibration de l'accepteur et du donneur de proton sensibles aux interactions moléculaires sont facilement identifiables.

Notre travail a porté sur deux sortes de polyamides représentatifs chacun de la classe des polyampholytes et des polybases généralisées: ce sont respectivement les polypeptides et les polyacrylamides N-disubstitués.

L'étude physicochimique de ces macromolécules, et plus particulièrement celle des polypeptides en tant que modèles de substances protéiniques plus complexes, fait toujours l'objet d'un très grand nombre de travaux. Ainsi l'analyse du phénomène de transition "hélice - pelote" des polypeptides est intéressante car de telles transitions sont probablement directement impliquées dans un certain nombre de processus biologiques importants. On dispose à l'heure actuelle d'une très abondante littérature sur l'aspect expérimental et théorique de ce phénomène. Toutefois, certains problèmes restent posés au niveau même du mécanisme de la transformation quand elle est induite par un solvant donneur de proton. Par exemple, les interactions spécifiques mises en jeu grâce aux propriétés acido - basiques de la chaîne polypeptidique et du milieu ne sont pas toujours bien dégagées des propriétés globales généralement observées ; de plus, les hypothèses de base du modèle d'interaction polypeptide - solvant servant de support à la théorie de la transition induite par le milieu n'ont pas encore été vérifiées expérimentalement. Enfin, si un certain effort a été fait pour déterminer les possibilités conformationnelles des diverses chaînes latérales autour des structures hélicoïdales des polymères, le comportement et le rôle éventuel de ces chaînes latérales au cours de la transition hélice - pelote n'ont guère été envisagés jusqu'ici.

Il nous a semblé possible de préciser ces divers points en étudiant, par spectroscopie infrarouge, la solvatation de quelques polypeptides en solution dans des milieux donneurs de proton connus pour provoquer la transformation hélice - pelote.

La comparaison des polymères et de composés modèles monomères simulant le motif principal peptidique ou le substituant latéral devrait permettre de dégager les principaux types d'interaction amide (ou chaîne latérale) - solvant polaire et de discuter les propriétés de l'unité séquentielle polypeptidique par rapport à l'élément isolé.

Nous avons fait précéder cette étude de celle d'un polyacrylamide N-disubstitué atactique et d'amides tertiaires modèles en solution dans divers milieux donneurs de proton. Pour un tel polymère pluriaccepteur de proton, les problèmes conformationnels précédemment discutés ne se posent pas. Toutefois il apparaît intéressant de comparer les propriétés basiques de sa séquence amide à celles des modèles. En effet, on peut concevoir qu'une telle

macromolécule en pelote statistique n'ait pas les mêmes possibilités de complexation avec le solvant actif que les composés monomères. Par ailleurs, l'examen de ce polymère constitue une première étape pour l'étude des polypeptides car il permet d'isoler, parmi les diverses possibilités d'interactions spécifiques intra - et intermoléculaires de la fonction peptidique, ses propriétés basiques vis-à-vis du milieu.

Tous ces polymères sont caractérisés par la présence, dans le motif de répétition, de la fonction amide secondaire ou tertiaire qui a des propriétés bien connues dont la principale est la conjugaison électronique du groupe : $^{+\delta}\ N\cdots C\cdots O\ ^{-\delta}$. D'un point de vue spectroscopique, les bandes d'absorption dites "bandes amide", typiques du groupe OCN, permettent l'étude de ces molécules.

Parmi les composés carbonylés, les amides possèdent des propriétés basiques très grandes. On a pu montrer que le site basique principal est le site C = O. En effet, la formation de complexes par liaison hydrogène avec des donneurs de proton ou même la protonation par les acides se font principalement sur l'atome d'oxygène.

Ces données nous seront essentielles pour résoudre les différents problèmes qui ont été sommairement évoqués et qui seront développés dans le présent mémoire pour lequel nous avons adopté un plan en deux parties.

Nous présenterons dans une première partie une méthode d'étude comparative de la basicité d'un polyacrylamide N-disubstitué et d'amides tertiaires modèles de sa séquence de répétition. L'examen de la solvatation de la fonction amide de ces composés dans des milieux donneurs de proton de forces croissantes permettra d'indentifier les divers modes d'interactions spécifiques et de déterminer les grandeurs thermodynamiques caractéristiques de la formation de l'un d'entre eux. Le comportement du polymère pourra alors être analysé en fonction des interactions non liées existant au sein des chaînes entre sites basiques. Dans la deuxième partie, nous envisagerons la transition hélice - pelote statistique de quelques polypeptides en milieux donneurs de proton. Après un rappel bibliographique des principaux résultats sur la conformation des polypeptides en solution et sur les travaux théoriques concernant la transition hélice - pelote, nous tenterons de mettre en évidence, dans un premier temps, sur un polymère à chaîne latérale simple, le mode d'interaction spécifique chaîne peptidique - acide carboxylique responsable de la transformation de structure. Puis, dans un deuxième temps, par le choix de polypeptides à chaînes latérales variées, nous analyserons les principales

caractéristiques expérimentales de la transition et mettrons en évidence le comportement des chaînes latérales polaires. Il nous sera alors possible de discuter les hypothèses de la théorie de la transition induite par le milieu.

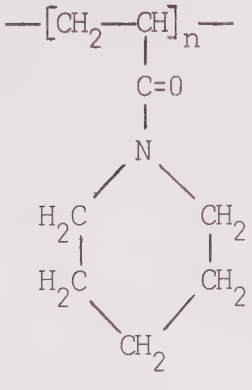
PREMIERE PARTIE

ETUDE DE LA SOLVATATION D'UN POLYACRYLAMIDE PAR LES SOLVANTS DONNEURS DE PROTON. COMPARAISON DE SA BASICITE ET DE CELLE D'AMIDES N-DISUBSTITUES MODELES

INTRODUCTION

L'étude des interactions des polyacrylamides et d'une manière générale des polybases de Lewis avec des donneurs de proton n'a fait l'objet que d'un nombre assez restreint de recherches spectroscopiques. Il faut citer cependant les travaux de MIKHAILOV et coll. (1), sur des esters polyacryliques, qui montrent, par spectroscopie infrarouge, que chaque groupement carbonyle d'une macromolécule est qualitativement moins basique que ceux des monomères hydrogénés correspondants. Par ailleurs, on relève l'étude effectuée postérieurement à la nôtre par BARON et coll. (2) sur la polysarcosine ; nous reviendrons par la suite sur les conclusions de ces derniers auteurs.

Nous examinerons un polyamide N-disubstitué : le polyacrylopipéridide



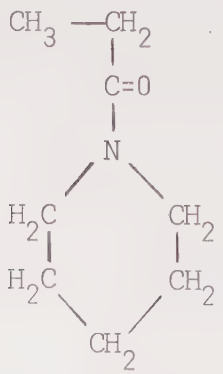
(PAP)

L'absence d'atome d'hydrogène acide sur la fonction amide de ce polymère a pour conséquence de conférer à ce dernier des propriétés pluriacceptrices de proton seulement.

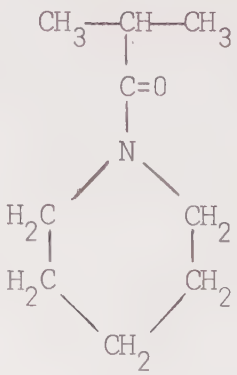
Un tel polyacrylamide peut être obtenu par deux voies distinctes qui diffèrent par la nature du catalyseur de polymérisation. La première technique est une polymérisation "radicalaire" : on emploie des catalyseurs libérant, au début de la polymérisation, des radicaux libres. Ces catalyseurs sont généralement des azoïques qui conduisent à des polymères solubles et atactiques, ne présentant aucune régularité spatiale des motifs répétitifs*. Le polyacrylopipéridide "radicalaire" que nous utiliserons a été synthétisé en présence d'azo - bis - isobutyronitrile (3). Il est aussi possible de préparer ce polymère par "initiation anionique". Dans ce mécanisme, l'extrémité par où se fait la croissance de la macromolécule porte constamment une charge électrique négative. L'initiateur employé a été le phényllithium ; il conduit à un polymère stéréorégulier isotactique. Toutefois ce dernier est très peu soluble dans les solvants transparents au rayonnement infrarouge, aussi étudierons-nous exclusivement le polymère "radicalaire" dont quelques propriétés physico - chimiques sont rassemblées ci-dessous :

- point de fusion : 170°C
- viscosité intrinsèque : $[\eta]_{25°C}$ = 56 cm^3/g (dans HCOOH)
- clichés DEBYE - SCHERRER: polymère totalement amorphe
- solubilité : CCl_4, CH_2X_2, CHX_3, C_6H_6, alcools, acides carboxyliques.

Pour analyser le comportement de ce polymère en présence de divers solvants donneurs de proton et en particulier pour évaluer sa basicité, nous avons examiné parallèlement des composés modèles, amides N-disubstitués simples dont la structure rappelle celle du motif répétitif des chaînes. Ce sont principalement les propionopipéridide (PP) et isobutyropipéridide (iBP):



(PP)



(iBP)

---

* Néanmoins, il semble que l'empêchement stérique des substituants favorise une addition syndiotactique pour laquelle les substituants sont répartis périodiquement de part et d'autre de la chaîne principale supposée en zig-zag planaire. Lorsque les substituants sont disposés du même côté de la chaîne, toujours en zig-zag planaire, le polymère est dit isotactique.

En outre, pour certaines interprétations, nous avons été amené à utiliser d'autres amides tertiaires simples tels que le N,N-diméthylacétamide (DMA).

Tous ces composés, amides modèles et polymère, sont caractérisés par une bande d'absorption intense entre 1600 et 1700 cm^{-1} dûe à l'élongation de la liaison C=O. La faible dépendance de cette vibration vis à vis des autres mouvements de la molécule en favorise l'étude.

Dans ce travail, nous analyserons systématiquement le comportement des groupes carbonyle du PAP et des composés modèles en solution dans divers solvants ou mélanges de solvants dont l'un est un donneur de proton moyennement fort. La mise en évidence de la solvatation de ces molécules permettra de comparer leurs basicités relatives d'un point de vue qualitatif ; en outre une détermination des grandeurs thermodynamiques caractérisant la complexation des diverses fonctions amide avec certains accepteurs d'électrons précisera les différences observées. Enfin nous réserverons un chapitre de ce mémoire aux interactions existant entre ces amides et des donneurs de proton très forts tels que les acides carboxyliques.

CHAPITRE I

ETUDE DE LA BASICITE COMPAREE DU POLYACRYLOPIPERIDIDE ET DES AMIDES MODELES FIGURANT SA SEQUENCE

Dans une série de composés carbonylés, les variations de fréquences de la vibration $\nu(C=O)$ mesurées dans différents solvants peuvent être reliées à la basicité relative des molécules. Pour cela, diverses méthodes peuvent être utilisées ; une critique de l'ensemble des travaux antérieurs a été faite par LASCOMBE en 1960 (4).

Par ailleurs, la technique des "solvants mixtes" (4) qui consiste à étudier le composé en solution dans un mélange de solvants dont l'un est inerte et l'autre actif (par exemple un donneur de proton) de fraction molaire x variable, est particulièrement efficace pour la mise en évidence des formes d'interaction, en particulier des complexes par liaison hydrogène qui peuvent s'établir entre la molécule et le milieu. Une mise au point sur l'ensemble des résultats obtenus dans ces conditions a été publiée en 1970 (5).

Enfin la détermination des grandeurs thermodynamiques caractéristiques d'un équilibre d'association donneur-accepteur d'électrons peut être faite par spectroscopie infrarouge dans un certain nombre de cas simples. Divers travaux de base publiés dans le passé (6 à 9) ont mis au point une méthode générale.

1.1.1. - Etude des mélanges binaires amide - solvant et polyacrylopipéridide - solvant

Dans le tableau I sont rassemblées les fréquences de vibration de valence ν(C=O) du PAP, du PP et du iBP en solution diluée dans un grand nombre de solvants purs. Ces derniers sont, soit des donneurs de proton (n-butanol, trichloroéthanol, chloroforme....) soit des accepteurs de proton (dioxanne -1,4, diméthylsulfoxyde ....) soit des solvants peu actifs (hexane, tétrachlorure et sulfure de carbone, benzène, etc...). La teneur des solutions en amide est de l'ordre de 0,05 M/l. La concentration du polymère, évaluée en motif - gramme par litre, est du même ordre de grandeur.

Tableau I : Influence de la nature du solvant sur les valeurs des fréquences ν(C=O) du propionopipéridide, de l'isobutyropipéridide et du polyacrylopipéridide.

Solvants	Propionopipéridide	Isobutyropipéridide	Polyacrylopipéridide
Hexane	1667	1661	insoluble
Tétrachloroéthylène	1655	1651	1638
Tétrachlorure de carbone	1650	1646	1639
Sulfure de carbone	1650	1646	1640
Benzène	1649	1646	1640
Triéthylamine	1661	1656	insoluble
Acétonitrile	1640	1635	1632
Dioxanne-1,4	1648	1645	1639
Ether éthylique	1659	1653	insoluble
Diméthylsulfoxyde	1635	1631	insoluble
Chlorure de méthylène	1633	1630	1633
Bromure de méthylène	1631	1627	1631
Chloroforme	1625	(1634) ép.^{t}-1619	1633
Bromoforme	1624	(1633)ép.^{t}-1619	1627
n-Butanol	1629-(1595)ép^{t}.	1623-(1596)ép^{t}.	1637-1619
Trichloroéthanol	1611-1588	1610-1584	(1630)ép^{t}.-1614

Les fréquences sont exprimées en cm^{-1}.

On constate en premier lieu que, dans un même solvant peu actif (tétrachlorure de carbone, sulfure de carbone, etc) la fréquence $\nu(C=O)$ du polymère est systématiquement plus faible que celle des amides simples. Il est possible de rendre compte de cet abaissement en comparant l'influence de l'état physique des amides sur les fréquences $\nu(C=O)$. Le tableau II montre ainsi que la fréquence $\nu(C=O)$ du PP est plus faible à l'état liquide pur qu'en solution diluée, ce qui est l'indice certain d'interactions d'origine dipolaire entre groupements carbonyle. Il est très vraisemblable que des interactions analogues,présentes au sein d'une même macromolécule isolée en solution diluée, soient la cause de la diminution de fréquence observée pour le polymère.

Tableau II : Influence de l'état physique sur la valeur de la fréquence $\nu(C=O)$ du propionopipéridide et du polyacrylopipéridide

Propionopipéridide	Solvant : hexane	1667
	Solvant : tétrachlorure de carbone	1650
	état liquide pur	1645
Polyacrylopipéridide	Solvant : tétrachlorure de carbone	1639
	état solide	1634

Les fréquences sont exprimées en cm^{-1}

Cette interprétation est confirmée par l'influence de la température sur les valeurs des fréquences $\nu(C=O)$, d'une part du PP et du PAP en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone (fig.1), d'autre part du PP à l'état liquide pur. Avec le PP en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone, la fréquence $\nu(C=O)$ augmente nettement quand on passe de 25 à 125°C (fig.1). Par contre, à l'état liquide pur, il n'est pas possible de déceler une variation de fréquence. L'agitation thermique dont l'énergie est sans doute très inférieure à celle des interactions dipolaires entre fonctions amide n'est pas suffisante pour détruire les agrégats. Avec les solutions de polymère dans le tétrachlorure de carbone (fig.1), la variation de fréquence relativement faible que l'on observe

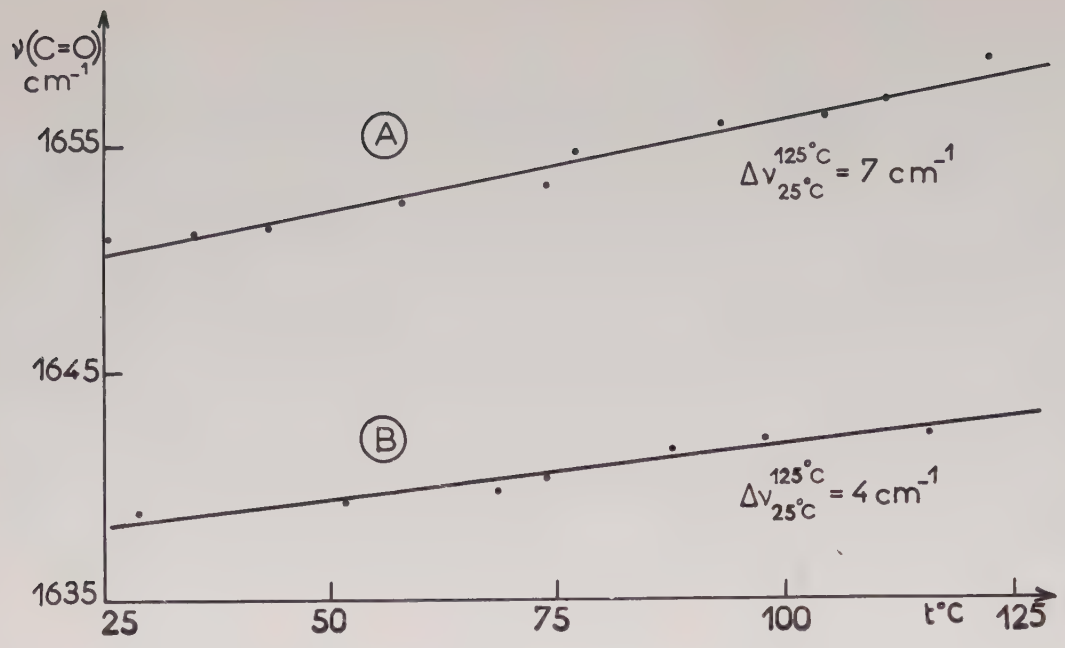


Fig. 1 Influence de la température sur les fréquences ν (C = O) du PP (A) et du PAP (B) en solution diluée dans CCl_4

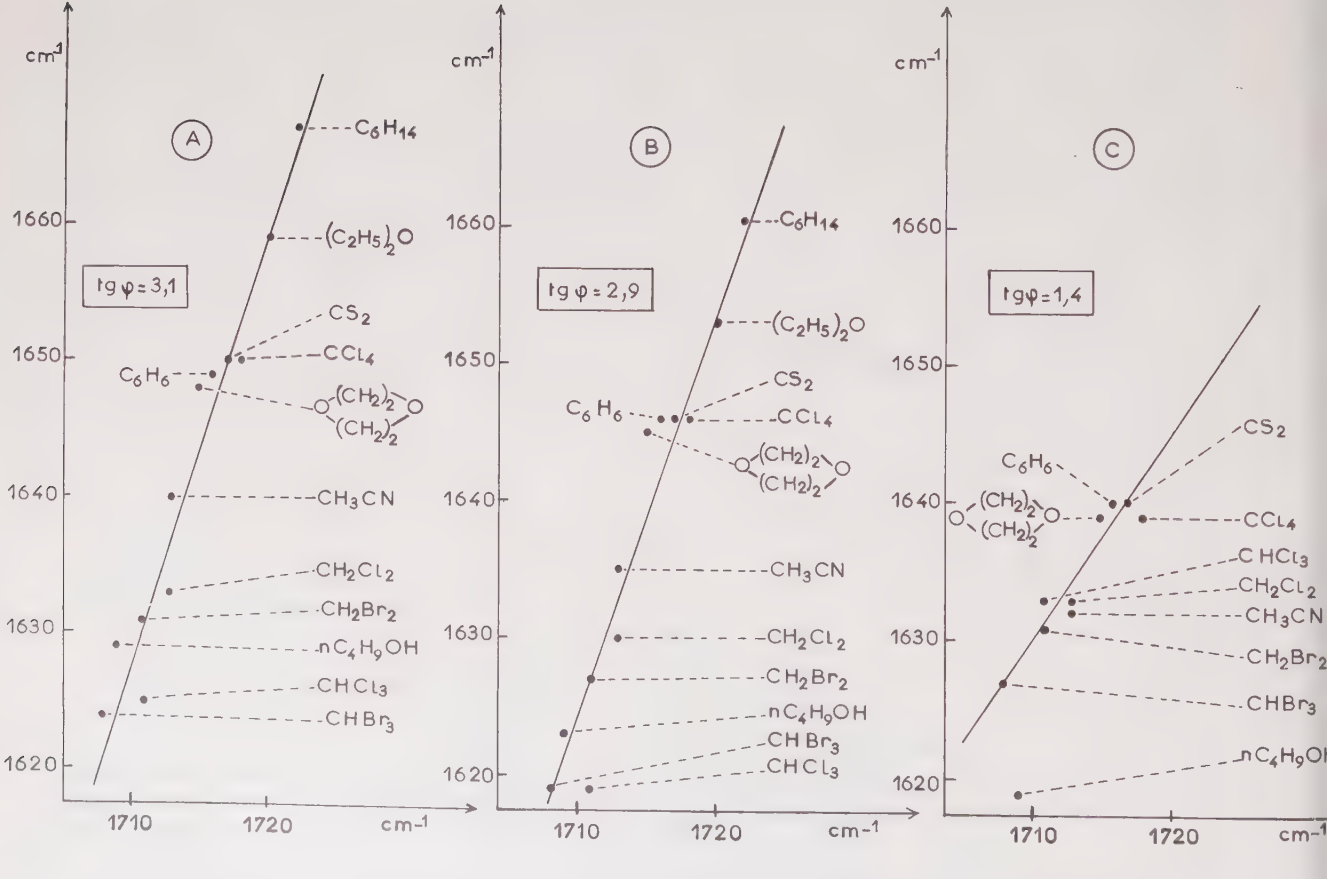


Fig. 2 Comparaison des fréquences ν(C = O) du PP (A), du iBP (B) et du PAP (C) (en ordonnées) avec les fréquences ν(C = O) de l'acétone (en abscisses).

suggère donc à nouveau des interactions dipolaires assez fortes entre les diverses fonctions amide d'une même chaîne.

De plus, comme l'indique le tableau I, le polymère apparait moins sensible au caractère donneur de proton du solvant que ne le sont les amides figurant sa séquence moléculaire. Ceci peut être précisé par la méthode graphique proposée par BELLAMY et coll. (10) montrant l'existence d'une relation linéaire entre les fréquences $\nu(C=O)$ de deux composés carbonylés d'une série homologue étudiés en solution diluée dans divers solvants. La comparaison des pentes des droites obtenues en portant les fréquences de l'un des vibrateurs en fonction de celles du second permet de classer les différents groupements carbonyle examinés suivant leur polarité. Par rapport à l'acétone pris comme référence, on observe des droites de pente voisine de 3 pour les deux amides modèles et de l'ordre de 1,4 pour le polymère (fig.2). Pour les premiers composés, cette valeur est remarquablement élevée par rapport à celles obtenues pour l'acétaldéhyde : 0,85, le butyrate d'éthyle : 1,6 ou le N - méthylacétamide : 2,35 (11, 12). Ces amides tertiaires sont donc très sensibles aux effets de solvants ; leur caractère basique très prononcé est à rapprocher de l'importante délocalisation électronique du groupe OCN. La plus faible valeur de la pente observée pour le polymère est en relation avec la basicité réduite de ses groupes carbonyle. Outre les interactions dipolaires carbonyle-carbonyle, la conformation globale adoptée par le polymère en solution est probablement la cause d'un encombrement stérique qui s'oppose à l'approche des molécules complexantes de solvant.

1.1.2. - Etude des mélanges ternaires amide (ou polyacrylopipéridide)-solvant donneur de proton - solvant inerte

Pour comparer, par la méthode des solvants mixtes, le polyacrylopipéridide et ses molécules modèles, nous avons utilisé comme donneurs de proton des alcools aliphatiques (méthanol, n-butanol, trichloroéthanol) et des halogénoformes (chloroforme, bromoforme). Les concentrations en amide (ou en polymère) ont été maintenues constantes à 0,05 M/l (ou motif - gramme/l) tandis que la fraction molaire du donneur de proton était progressivement augmentée.

On sait que le groupe carbonyle est susceptible d'accepter en solution une ou deux liaisons hydrogène selon le donneur de proton choisi. Nous avons récemment publié un mémoire de synthèse de l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet (5), aussi nous y référerons-nous pour l'interprétation des spectres qui vont être présentés.

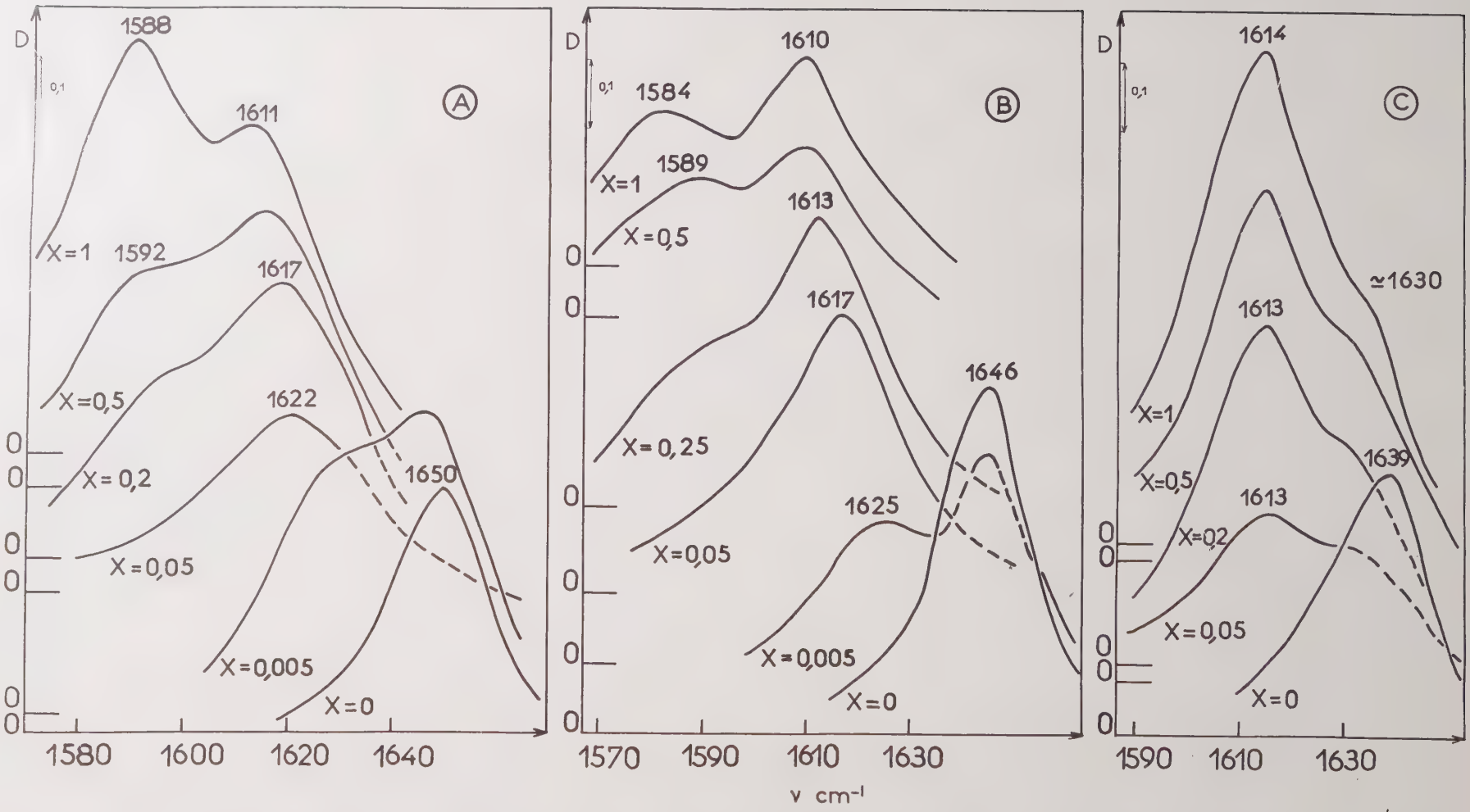
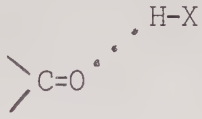


Fig. 3 Massifs d'absorption ν(C = O) du PP (A), du iBP (B) et du PAP (C) dans des mélanges TCE - CCl_4 (x fractions molaires d'alcool).

1.1.2.1. - Interactions amides - alcools

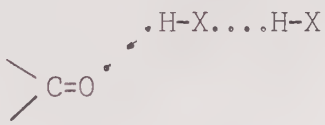
Nous donnerons à titre d'exemple les spectres enregistrés dans le cas du trichloroéthanol (TCE). Les résultats y sont qualitativement identiques à ceux obtenus avec les autres alcools aliphatiques. Sur la figure 3 sont ainsi représentés entre 1550 et 1700 cm^{-1} les spectres de solutions diluées de PP, de iBP et de PAP dans des mélanges CCl_4 - TCE.

Dans le cas du PP (courbe A) et pour des fractions molaires faibles en TCE, on observe, en plus de la bande caractéristique des vibrateurs C=O "libres" (1650 cm^{-1}), une bande dont l'intensité croît rapidement avec la fraction molaire en alcool et qui correspond à la formation d'un complexe par liaison hydrogène du type :



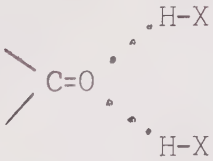
(I)

La fréquence de cette bande d'absorption diminue sensiblement lorsque l'on concentre le mélange en alcool. Cette variation, déjà observée lors d'expériences analogues, est généralement attribuée à la modification de la nature du milieu environnant le complexe et également à la possibilité de formation d'un complexe en chaîne du type (4, 5, 13) :



(B)

A partir d'une fraction molaire en alcool de l'ordre de 0,2, il apparaît une troisième bande ν(C=O) de fréquence plus basse que les précédentes et caractéristique de la formation d'un complexe de type (4, 5, 14, 15) :



(C)

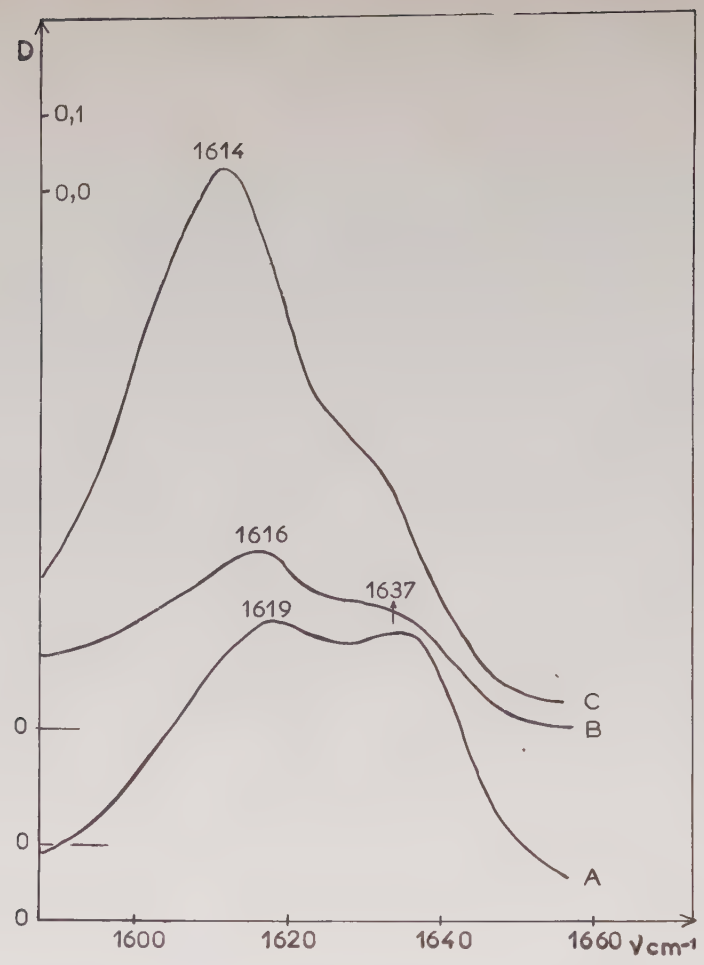


Fig. 4 Bande ν (C = 0) du PAP en solution diluée dans les alcools purs. A : n-butanol, B : méthanol, C : trichloroéthanol.

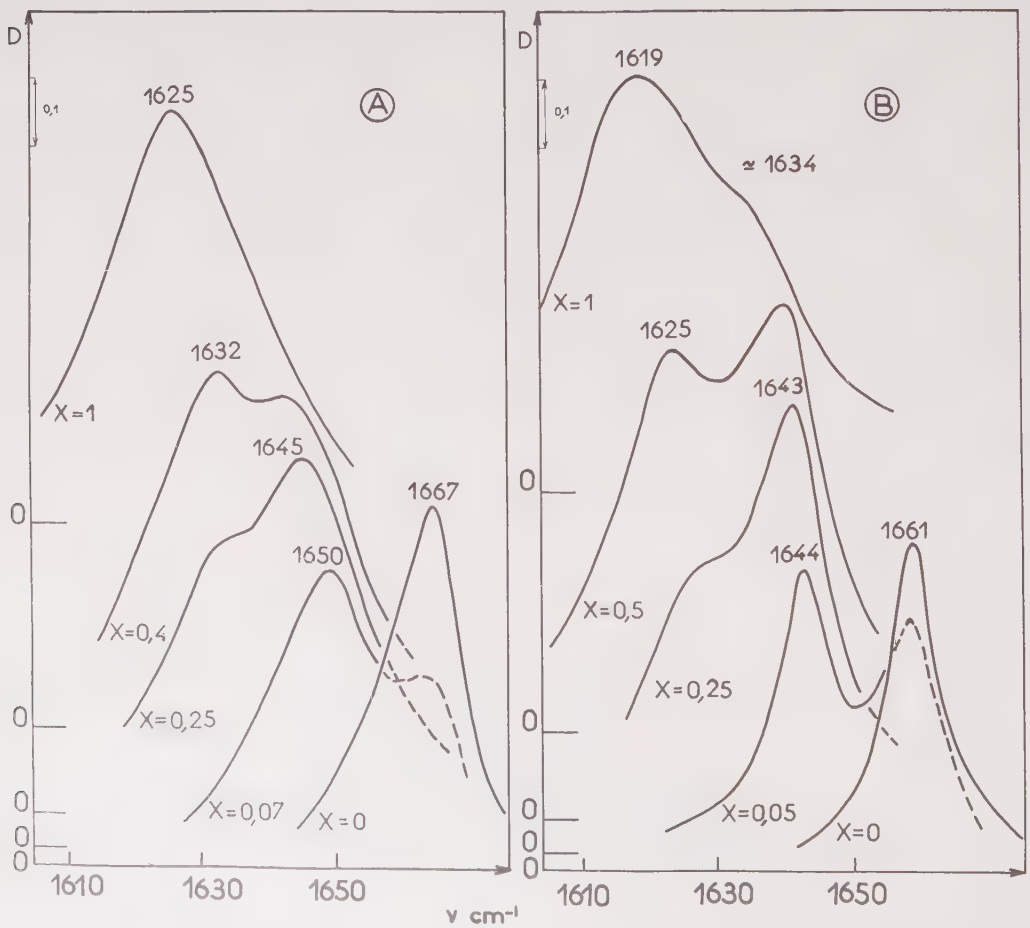


Fig. 5 Massifs d'absorption ν(C = 0) du PP (A) et du iBP (B) dans des mélanges $CHCl_3$ -

L'analyse des spectres de la fig.3B conduit aux mêmes conclusions pour les complexes formés par le iBP. Toutefois, la comparaison des spectres obtenus pour ces deux composés en solution dans TCE pur (x = 1) révèle quelque différence ; ainsi, le complexe de type (C) semble prédominer pour le PP alors que le complexe de type (I) constitue la forme associée principale du iBP.

L'étude analogue des solutions de PAP dans des mélanges TCE - CCl_4 (fig.3C) montre que l'association se limite à la formation du complexe (I). Dans le mélange particulier PAP - alcool pur, le polymère n'est d'ailleurs pas entièrement complexé, comme en témoigne la présence d'un épaulement ν(C=O) vers 1630 cm^{-1}.

La figure 4 permet de comparer la complexation du polymère avec différents alcools. Les spectres montrent une association croissante lorsqu'on passe du butanol normal au méthanol et au trichloroéthanol et indiquent qu'il y a toujours coexistence de groupes C=O "libres" et "associés" de type (I).

1.1.2.2. - Interaction amides - halogénoformes

Sur la figure 5 sont représentés les spectres d'absorption infrarouge, entre 1600 et 1680 cm^{-1}, des solutions de PP et de iBP dans des mélanges d'hexane et de chloroforme. On constate dans les deux cas la formation de complexes par liaison hydrogène de type (I) et (C). Dans le chloroforme pur, alors que le PP est entièrement associé au donneur de proton sous forme de complexe de type (C), ce dernier coexiste, pour le second amide, avec une proportion faible de complexe de type (I). On retrouve ici le caractère basique légèrement moins marqué du iBP par rapport au PP ; ceci peut s'expliquer par une différence d'encombrement stérique au niveau des carbones en α des groupes C=O de ces amides.

Des essais analogues entrepris avec le polymère en solution dans des mélanges de tétrachlorure de carbone et de chloroforme ne montrent qu'une diminution progressive et régulière de la fréquence de vibration ν(C=O) lorsque l'on concentre le solvant en chloroforme. Ce comportement s'explique par la grande proximité des fréquences mesurées dans le tétrachlorure de carbone (1639 cm^{-1}) et dans le chloroforme (1633 cm^{-1}) (tableau I). Cette dernière valeur de fréquence est cependant en bon accord avec la formation unique de complexe (I) comme le montre le spectre de iBP (fig.5B).

* *

*

Le polyacrylopipéridide s'associe donc beaucoup moins facilement avec les solvants donneurs de proton que les deux amides N-disubstitués qui représentent sa séquence moléculaire ; l'état de solvatation de ses fonctions amide diffère de celui des monomères : il ne forme pas, en particulier, de complexe géminé de type (C). Les conformations adoptées par le polymère en solution sont probablement la cause de cette diminution de pouvoir accepteur de proton : outre des interactions dipolaires entre sites carbonyle, elles peuvent créer un encombrement stérique susceptible de gêner la formation de liaisons hydrogène.

1.1.3. - Détermination des grandeurs thermodynamiques caractérisant l'association des accepteurs d'électrons avec le polyacrylopipéridide et ses molécules modèles

1.1.3.1. - Principe de la détermination

Afin de comparer directement les basicités relatives des groupements carbonyle appartenant aux amides simples et au PAP, nous avons déterminé les constantes de stabilité des complexes de Lewis de type (I) formés entre ces composés et un même réactif accepteur d'électrons A : soit l'iode, soit un phénol (orthocrésol, xylénol - 2,6).

Dans le cas général de la formation d'un complexe C entre un donneur d'électrons D et un accepteur d'électrons A selon :

$$A + D \rightleftarrows C$$

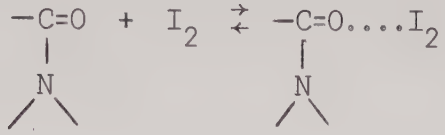
la constante d'équilibre peut s'écrire, si les solutions sont diluées (coefficients d'activité égaux à l'unité) :

$$K_1 = \frac{x_C}{x_A . x_D}$$

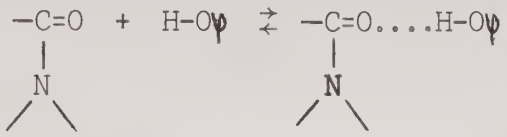
avec x_C = fraction molaire du complexe à l'équilibre, x_A, x_D fractions molaires de l'accepteur et du donneur libres. De même, on peut calculer la variation d'enthalpie libre $\Delta G° = -RT\text{Log } K_1$.

Si les expériences sont répétées à plusieurs températures, on en déduit les variations enthalpique $\Delta H°$ et entropique $\Delta S°$ caractéristiques de la complexation.

Pour les amides monofonctionnels, les constantes d'équilibre peuvent être mesurées par spectroscopie infrarouge en dosant, dans des mélanges ternaires accepteur - donneur - solvant inerte de composition connue, l'un des réactifs qui demeure à l'état libre. Ainsi dans le cas de l'iode :



on observe deux bandes de vibration $\nu(C=O)$ dans la région 1600 - 1700 cm^{-1}, attribuables aux molécules d'amide libres et associées avec l'iode. On mesure alors l'intensité de la bande caractéristique des vibrateurs carbonyle "libres" (7). Quand le réactif complexant est un phénol :



on préfère doser le phénol non engagé dans le complexe à partir de sa bande de vibration de valence $\nu(OH)$ "libre" (6). Celle-ci est en effet bien séparée ($\Delta\nu \simeq 200$ à 300 cm^{-1}) de la bande $\nu(OH)$ "associée", située vers 3300 cm^{-1}.

Il est à prévoir que dans les solutions étudiées, même très diluées en accepteur d'électrons, coexistent les complexes de type (I) et (B) (5, 6, 13, 16, 17, 18). Nous avons donc exploité nos résultats expérimentaux selon la méthode graphique préconisée par KLOTZ (9) et généralisée par NEEL et coll. (8) qui permet de déterminer directement la constante de stabilité K_1 du complexe (I), même en présence de complexe de type (B).

Lorsque le soluté donneur d'électrons est un polymère, la caractérisation thermodynamique de sa complexation avec les accepteurs d'électrons est rendue difficile par la présence d'un grand nombre de sites actifs dans chaque macromolécule. En effet, même si chaque centre ne se lie qu'avec une seule molécule d'acide, on doit prendre en considération un grand nombre de complexes de stoechiométries différentes. De plus, les macromolécules n'ont pas toutes le même nombre de sites actifs à cause de la polydispersité de l'échantillon.

Une analyse du problème, analogue à celle faite par KLOTZ et coll. (19) pour étudier les équilibres "acide/base" auxquels participent les protéines, montre que l'on peut surmonter ces difficultés. On suppose que tous les sites macromoléculaires ont un pouvoir d'association identique, ne dépendant pas du degré de polymérisation des chaînes et que la complexation de l'un d'entre eux ne perturbe pas celle de ses voisins. Il n'est alors pas nécessaire d'exprimer les teneurs des solutions de polymère en nombre de macromolécules, il suffit de se

rapporter au motif séquentiel, c'est-à-dire de donner les concentrations en motif - gramme par litre. On définit ainsi une constante d'équilibre rapportée aux fonctions amide du polymère, de forme identique à celle introduite pour les amides monofonctionnels, qui rend possible la comparaison des propriétés basique du polymère avec celles de molécules ne possédant qu'un seul site actif.

Quelques considérations simples permettent de justifier cela. Supposons que les macromolécules P ont toutes j centres basiques ne pouvant s'associer qu'avec une molécule d'acide A. On peut écrire la série d'équilibres:

$$P_o + A \underset{\leftarrow}{\overset{\rightarrow}{}} P_1 \qquad k_1$$

$$P_1 + A \underset{\leftarrow}{\overset{\rightarrow}{}} P_2 \qquad k_2$$

$$P_{i-1} + A \underset{\leftarrow}{\overset{\rightarrow}{}} P_i \qquad k_i = \frac{x_{P_i}}{x_{P_{i-1}} . x_A}$$

avec P_i : macromolécule dont i sites sont complexés, x_A : fraction molaire de l'acide non associé et x_{P_i} : fraction molaire de la macromolécule de type P_i. Les fractions molaires des sites libres (x_ℓ) et complexés (x_c) sont données par :

$$x_\ell = \sum_{i=1}^{j} (j - i + 1)\, x_{P_{i-1}} \qquad |1|$$

$$x_C = \sum_{i=1}^{j} i\, x_{P_i} = x_A \sum_{i=1}^{j} i.k_i .x_{P_{i-1}} \qquad |2|$$

Si tous les centres actifs ont un pouvoir d'association identique, il y a :

$C_i^j = \frac{j!}{i!(j-i)!}$ espèces différentes de macromolécules P_i

$C_{i-1}^j = \frac{j!}{(i-1)!(j-i+1)!}$ espèces différentes de macromolécules P_{i-1}

Désignons par K_1 la constante d'association d'une molécule d'acide avec un site de la macromolécule. La constante k_i peut s'exprimer en fonction de K_1 par :

$$k_i = \frac{C_i^j}{C_{i-1}^j} \quad K_1 = \frac{j - i + 1}{i} \quad K_1 \qquad |3|$$

la combinaison de |1|, |2| et|3| conduit à l'expression de la constante K_1

$$K_1 = \frac{x_c}{x_\ell \cdot x_A}$$

Il est facile de montrer qu'elle garde la même signification pour un polymère polydispersé si les propriétés des sites ne dépendent pas du degré de polymérisation. On peut noter en outre que, pour éviter les perturbations introduites par la complexation en un site de la macromolécule sur les sites voisins, il convient de faire les mesures en maintenant un taux de recouvrement du polymère aussi faible que possible :

$$\frac{\text{f.m. en sites complexés}}{\text{f.m. totale des sites}} \ll 1$$

Cela implique une fraction molaire initiale en acide plus faible ou du même ordre de grandeur que celle des centres basiques ; c'est aussi la condition requise pour éviter que sur un même site puissent se fixer plusieurs molécules d'acide.

1.1.3.2. - Résultats

Le tableau III rassemble les résultats obtenus dans les mélanges I_2 - CCl_4 pour le PP, le iBP, le PAP et le DMA, ce dernier ayant été ajouté dans un but comparatif. Les fractions molaires ont toujours été comprises entre 6 et 12.10^{-4} pour les amides simples et les motifs macromoléculaires et entre 25 et 42.10^{-4} pour l'iode. Le taux de recouvrement du polymère est alors compris entre 7 et 21 %. La grandeur $\Delta\nu$ définit l'écart en cm^{-1} entre les maximums des bandes d'absorption $\nu(C=O)$ des vibrateurs "libres" et "associés". Il ne nous a pas été possible de l'évaluer dans le cas du polymère à cause de la forte absorption du solvant.

Tableau III: Grandeurs thermodynamiques caractéristiques des équilibres amides N,N-disubstitués-iode en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone.

Amide	K_1 35°C	K_1 20°C	K_1 5°C	K_1 -10°C	K_1 25°C	$-\Delta H°$ (Kcal.mole^{-1})	$-\Delta G°_{25°C}$ (Kcal.mole^{-1})	$-\Delta S°$ (cal.mole^{-1}/K°)	$\Delta\nu_{20°C}$ (cm^{-1})
N,N-Diméthylacétamide	51	69	108	171	64	4,3 ± 0,4	2,5	6,3	45
Propionopipéridide	50	75	123	182	65	4,8 ± 0,5	2,5	7,8	50
Isobutyropipéridide	52	62	80	123	56	3,5 ± 0,5	2,4	3,7	43
Polyacrylopipéridide	23	49	68	100	44	3,7 ± 0,4	2,3	4,8	-

Tableau IV : Grandeurs thermodynamiques caractéristiques des équilibres amides N,N-disubstitués-xylénol-2,6 en solution diluée dans le tétrachlorure de carbone

Amides R–C(=O)–N⟨ ⟩ R	K_1 40°C	K_1 35°C	K_1 20°C	K_1 10°C	K_1 5°C	K_1 -5°C	K_1 -10°C	K_1 25°C	$-\Delta H°$ (Kcal.mole^{-1})	$-\Delta G°$ 25°C (kcal.mole^{-1})	$-\Delta S°$ (cal.mole^{-1}/°K)	$\Delta\nu$ 20°C (cm^{-1})
CH_3-CH_2		95	135		216		333	122	4,5	2,8	5,5	245
$CH_3-CH(CH_3)$		82	122		200		287	105	4,8	2,8	6,9	250
$CH_3-CH_2-CH(CH_3)$	87			162		242		112	4,6	2,8	5,0	262
$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2$	100			220		340		145	4,5	2,9	5,4	257
$CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH(CH_2-CH_3)$	83			205		303		132	5,3	2,9	8,0	258
$-[-CH_2-CH(-)-]_n$		47	65		95		158	58	4,4	2,4	6,8	278

Les constantes de stabilité et l'enthalpie de formation que nous avons trouvées dans le cas du DMA sont cohérentes avec celles que DRAGO et coll. (20) ont déterminé par spectroscopie U.V. : $K_{25°C} = 69$, $\Delta H° = -4,0$ Kcal.mole^{-1}, mais différentes de celles obtenues par spectroscopie IR par les mêmes auteurs (21).

Le tableau IV montre les résultats concernant l'un des deux phénols utilisés : le xylénol - 2,6. Il contient en outre, dans un but comparatif, les données illustrant les mêmes expériences effectuées avec trois autres molécules modèles. Les fractions molaires ont été comprises entre 21 et 57.10^{-4} pour les fonctions amide et 11 et 31.10^{-4} pour le xylénol - 2,6, le taux de recouvrement du polymère variant alors entre 8 et 17 %. $\Delta\nu$ représente ici la différence de nombre d'onde entre les maximums des bandes de vibration ν(OH) caractérisant les molécules de phénol libres et associées.

Ces deux tableaux montrent que le groupement carbonyle contenu dans chaque séquence du PAP est nettement moins basique que celui des amides simples. La constante relative à la formation de complexes de type (I) sur chaque site basique de la macromolécule est en effet systématiquement plus faible*. Cette différence est particulièrement nette lors de la complexation avec le xylénol - 2,6 : dans ce cas, le rapport des constantes est de l'ordre de 0,5. Cette valeur voisine de 0,5 a été retrouvée en choisissant l'orthocrésol comme donneur de proton. A nouveau, le tableau IV montre que la présence d'un carbone tertiaire en α du groupement C=O n'explique pas à elle seule la faible basicité du polymère.

---

* On note que, si la constante de complexation K_1 de chacune des séquences macromoléculaires est la plus faible, la grandeur $\Delta\nu$ prend, par contre, une valeur légèrement plus importante pour le polymère (278 cm^{-1}) que pour les cinq amides simples (245-262 cm^{-1}). L'inversion observée semble indépendante de la nature du donneur de proton puisque les valeurs obtenues avec le couple orthocrésol - tétrachlorure de carbone sont respectivement 325 et 300 cm^{-1} pour le PAP et pour le PP. Cette singularité qu'il ne nous a pas été possible d'interpréter jusqu'ici, montre qu'il est quelquefois hasardeux de comparer des pouvoirs complexants par la seule considération des déplacements de fréquence ν(OH) et qu'il est préférable, dans la mesure du possible, de confronter l'ensemble des grandeurs thermodynamiques (22).

1.1.4. - Discussion

Les diverses méthodes d'analyse comparative employées mettent en relief la faible basicité du polymère par rapport aux amides modèles. Les différences de solvatation observées dans les solvants moyennement donneurs de proton traduisent le pouvoir accepteur de proton relativement peu accentué de la séquence amidique des chaînes.

Les expériences réalisées montrent que, pour expliquer ce comportement, il faut considérer des interactions dipolaires assez fortes entre les fonctions carbonyle des chaînes, interactions atténuant sensiblement la basicité de chaque groupement amide. La flexibilité des chaînes, qui conduit à des conformations macromoléculaires plus ou moins repliées sur elles-mêmes, favorise vraisemblablement ces interactions en rapprochant les sites basiques et rend ainsi plus difficile l'approche des molécules complexantes.

Ce type d'étude a été récemment poursuivi par BARON et coll. (2) dans le cas d'autres polyamides N-disubtitués : la polysarcosine -$[-CO-N(CH_3)-CH_2-]_n$ et le N-méthylpolyundécanamide : -$[-N(CH_3)-(CH_2)_{10}-CO-]_n$ comparés à diverses molécules modèles (monomères, dimères). Ces auteurs ont observé une forte réduction de basicité pour les groupes C=O de la polysarcosine par rapport aux amides modèles et ont constaté, par contre, que le comportement du N-méthylpolyundécanamide est tout à fait analogue à celui des petites molécules. Le résultat concernant ce dernier polymère, dans lequel les fonctions carbonyle sont séparées par dix groupes CH_2, met en relief l'importance des effets dipolaires directs entre fonctions amide voisines pour rendre compte de l'abaissement de basicité de la polysarcosine et probablement aussi du polyacrylopipéridide.

CHAPITRE II

ETUDE DES INTERACTIONS AMIDES (ET POLYAMIDE) - ACIDES CARBOXYLIQUES

LIAISON HYDROGENE ET PROTONATION

Nous avons jusqu'ici comparé la basicité du polyacrylopipéridide et de ses modèles dans des milieux faiblement donneurs de proton ; nous allons maintenant poursuivre notre étude avec des solvants beaucoup plus acides susceptibles, comme nous allons le voir, de protoner ces fonctions amide tertiaires.

1.2.1.-Rappels sur le phénomène de protonation des amides

On sait qu'en présence d'un acide très fort comme HCl, H_2SO_4 ou HSO_3F, les amides sont susceptibles d'être protonés selon la réaction de transfert du proton acide :

$$B + H^+ \rightleftarrows BH^+ \qquad |1|$$

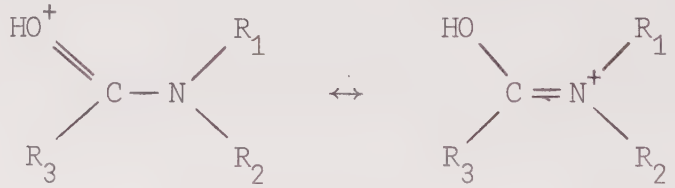
Ce sont des bases relativement faibles dont le pK peut être déterminé à partir des fonctions d'acidité de HAMMETT et de techniques classiques telles que la spectroscopie U.V.*. Les valeurs ainsi obtenues montrent que les amides sont des bases moins fortes que les amines mais dont la protonation est toutefois assez aisée.

---

* Une interessante mise au point sur cette question a été faite par ARNETT (23).

Si une très abondante littérature a été publiée sur le phénomène de protonation des amides, c'est en raison d'une part, du problème posé par la détermination de leur site de protonation, d'autre part,à cause de l'intérêt d'une telle étude pour la compréhension de certains phénomènes structuraux apparaissant avec des composés d'intérêt biologique (polyamides, polypeptides) comme nous le verrons dans la suite de ce travail.

La localisation du site de protonation a été très discutée ces dernières années. Il est maintenant bien établi que l'ion H^+ se fixe préférentiellement sur l'oxygène ; cette conclusion découle essentiellement de spectres RMN et infrarouges. Par RMN, en effet, on a observé un signal attribuable à une forme OH et déterminé une barrière de rotation de la liaison C - N plus élevée pour le sel d'amide que pour l'amide neutre (24 à 29). Par spectroscopie infrarouge, l'ion amidium présente une bande assez intense entre 1600 et 1700 cm^{-1} dont la fréquence reste inchangée par substitution isotopique $^{16}O \rightarrow {}^{18}O$ (30, 31) ; elle ne peut donc être attribuée à la vibration de valence $\nu(C=O)$ du groupe carbonyle, ce qui détruit le principal argument en faveur de la protonation sur l'atome d'azote. Cette bande peut correspondre, comme certains auteurs l'ont suggéré (32, 33), à une vibration du groupe OCN mettant particulièrement en jeu la liaison C - N qui, par suite de la protonation sur l'atome d'oxygène, acquiert un fort caractère de double liaison :



La vibration de valence du groupe carbonyle des formes protonées serait alors située vers 1400 cm^{-1} (32, 33). On a pu aussi localiser les vibrations de valence et de déformation du groupe OH (32, 33, 34).

Ainsi, l'action d'un donneur de proton sur un amide peut conduire, selon l'acidité du donneur, à un complexe par liaison hydrogène ou à des ions. On peut donc espérer observer en solution avec des acides de force moyenne la présence simultanée du premier et des seconds ou, en d'autres termes dus à MULLIKEN (35), celle d'un "complexe externe" et d'un "complexe interne". Ce dernier résultant du transfert de proton de l'acide vers la base est susceptible ensuite de se dissocier en ions libres. On peut considérer qu'il y a équilibre

entre les différents produits de la réaction (36) :

$$XH + B \rightleftarrows \underset{(I)}{XH \ldots B} \rightleftarrows \underset{(II)}{X^- \ldots HB^+} \rightleftarrows X^- + HB^+ \qquad |2|$$

De tels équilibres entre "complexes externes" et "complexes internes" ont déjà été mis en évidence au moyen des spectroscopies infrarouge et ultraviolette ; les bases et les acides utilisés étaient des amines, des phénols ou des acides carboxyliques (37 à 41).

Dans le cas des amides, ce type d'étude est important en raison des renseignements que l'on peut espérer en tirer, comme nous l'avons dit, pour les polypeptides. Certes, l'interaction amide - acide a déjà fait l'objet de quelques travaux fragmentaires (42 à 45) mais pas, à notre connaissance, dans la perspective que nous avons évoquée et qui est schématisée dans les équilibres de la relation |2|.

Nous examinerons successivement les spectres enregistrés avec les amides modèles en présence d'acide acétique, puis en présence des acides trichloro - et trifluoroacétiques. Nous aborderons enfin l'étude des solutions de polyacrylopipéridide. Le solvant inerte utilisé est, selon le cas, soit CH_2Cl_2, soit C_2Cl_4. Les concentrations en amide (ou en polymère) ont été maintenues à une valeur fixe comprise entre 0,2 et 0,5 M/l (ou motif - gramme/l).

1.2.2.- Interactions amides-acides carboxyliques

1.2.2.1. - Cas de l'acide acétique

Sur les figures 6 et 7 sont représentés les spectres d'absorption infrarouge entre 1550 et 1700 cm^{-1} de solutions diluées de DMA, PP et iBP dans des mélanges d'acide acétique et de tétrachloroéthylène.

La bande de valence $\nu(C=O)$ de l'amide "libre" est observée dans le tétrachloroéthylène entre 1650 et 1665 cm^{-1}. Par addition d'acide apparaît une bande de plus basse fréquence qui correspond aux complexes (I) formés par liaison hydrogène entre l'amide et l'acide. La fréquence de cette bande varie un peu en fonction de la concentration en acide comme cela a été observé dans le cas de la complexation par les alcools. On peut donc attribuer cette variation à la modification du milieu environnant le complexe ou à l'apparition de complexes en chaîne de type (B) (4, 5, 13). En solution diluée dans l'acide acétique pur, les molécules d'amide sont en forte proportion sous forme de com-

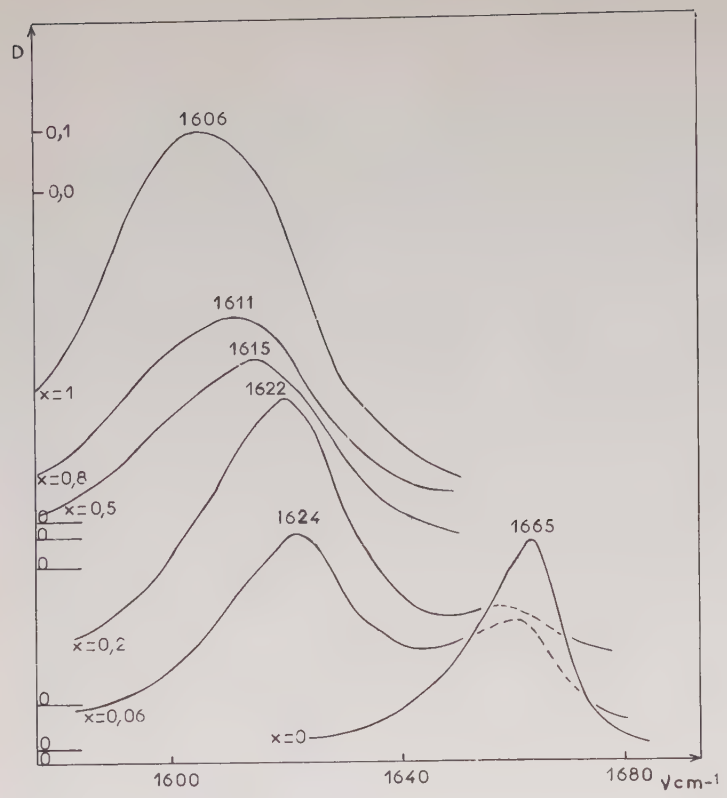


Fig. 6 Massif d'absorption ν(C = O) du DMA dans des mélanges CH_3COOH - C_2Cl_4 (x : fractions molaires d'acide)

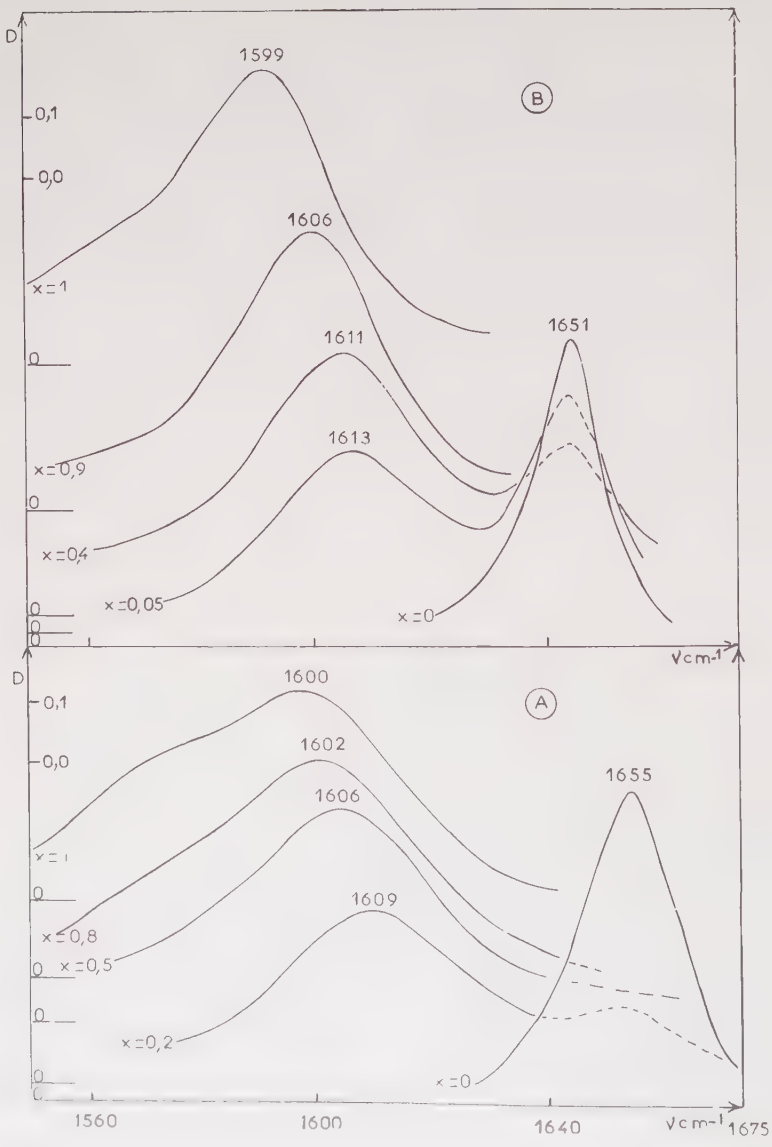


Fig. 7 Massifs d'absorption ν(C = O) du PP (A) et du iBP (B) dans des mélanges CH_3COOH - C_2Cl_4 (x : fractions molaires d'ac

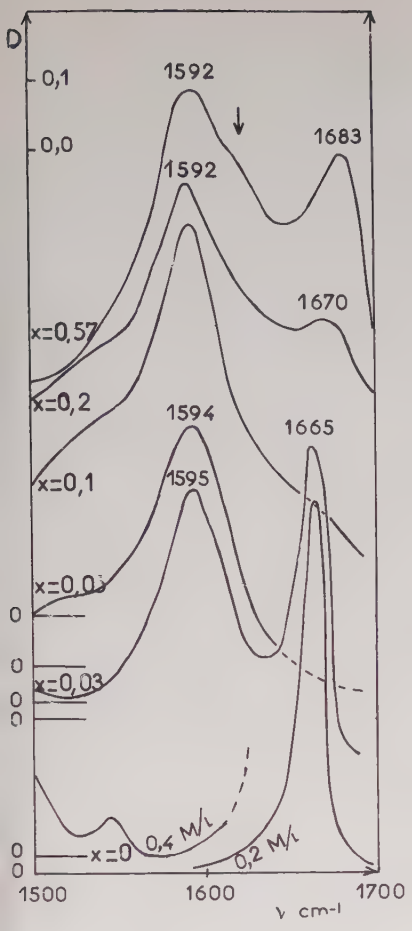


Fig. 8 Massif d'absorption ν(C = O) du DMA dans des mélanges CCl_3COOH - C_2Cl_4 (x : fractions molaires d'acide).

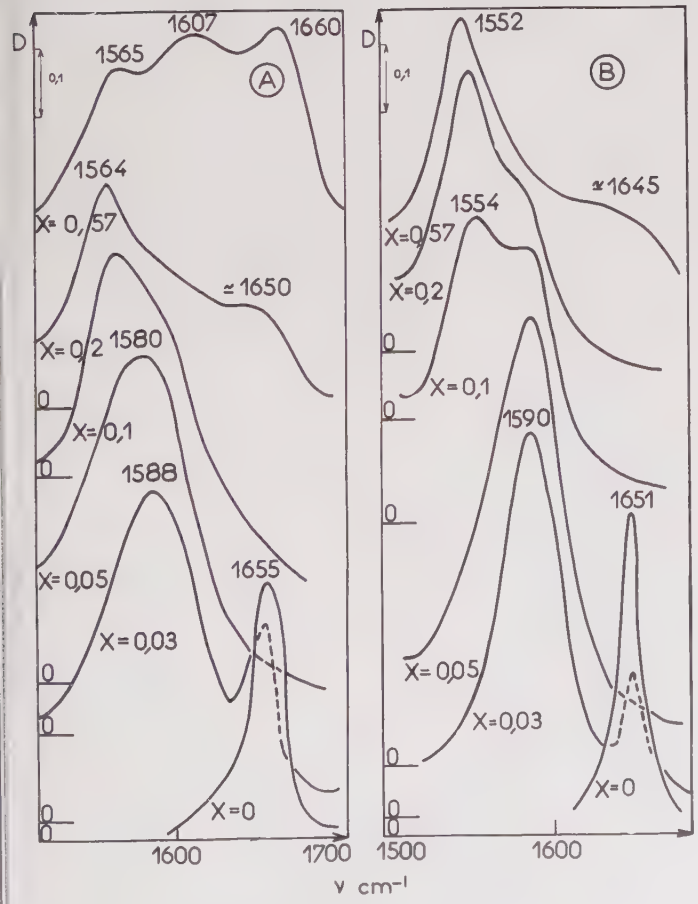


Fig. 9 Massifs d'absorption ν(C = O) du PP (A) et du iBP (B) dans des mélanges CCl_3COOH - C_2Cl_4 (x : fractions molaires d'acide).

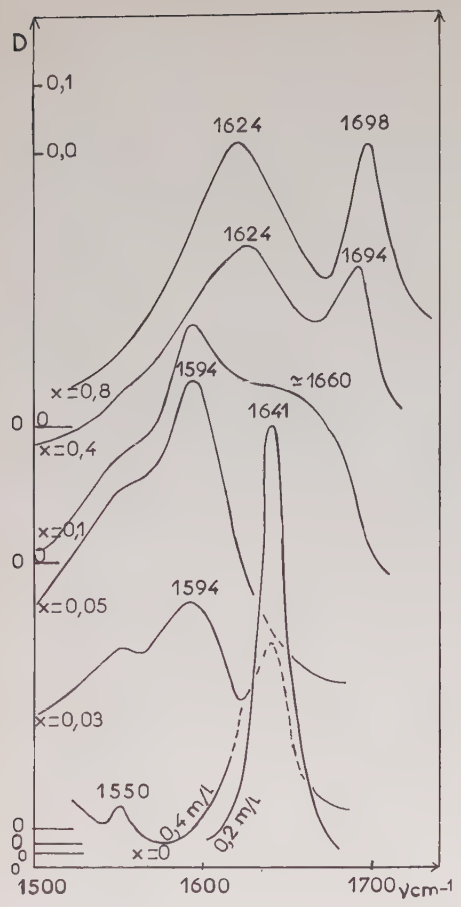
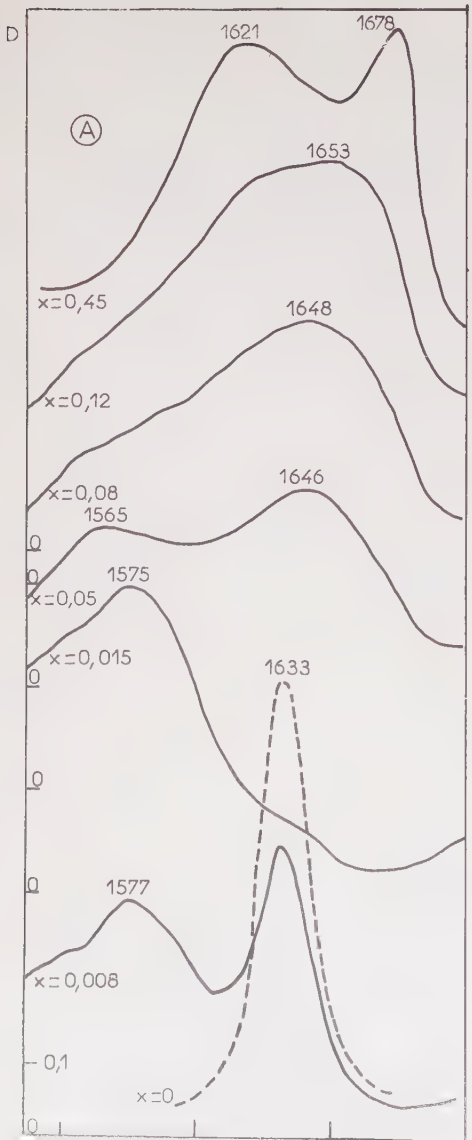


Fig. 10 Evolution de la bande ν(C = O) du DMA dans des mélanges CF_3COOH-CH_2Cl_2 (x : fractions molaires d'acide).



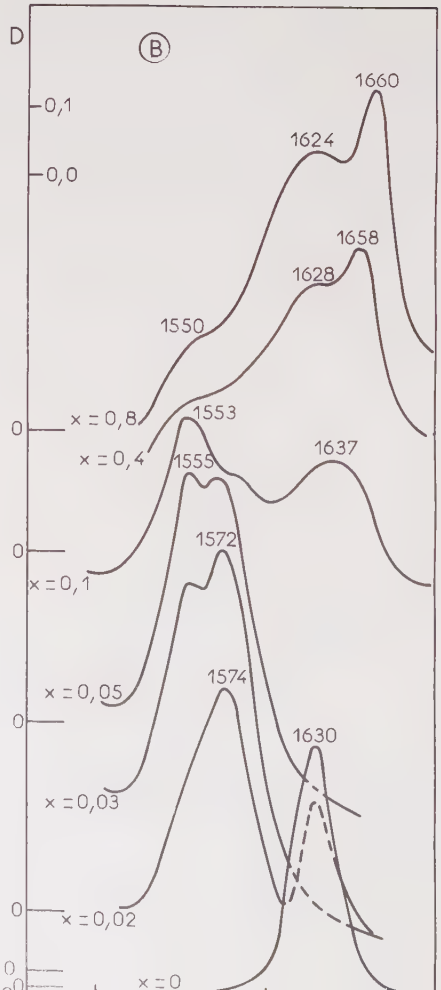


Fig. 11 Evolution des ba
ν(C = O) du PP
et du iBP (B) da
mélanges CF_3COOH
CH_2Cl_2 (x : frac
molaires d'acide

plexes (I) et peut-être (B).

Si l'on compare ces résultats à ceux qui ont été obtenus avec des acides moins forts, comme le chloroforme ou les alcools, on remarque que l'apparition de complexe I (ou B) demande l'addition de quantités relativement importantes d'acide acétique. En outre, même quand les complexes I (ou B) sont en gros excès, il ne se forme pas de complexe de type (C) dans lequel l'oxygène accepte deux liaisons hydrogène et dont la fréquence serait voisine de 1550 cm^{-1}. Cela provient de la forte autoassociation de l'acide qui entre en compétition avec la complexation. Toutefois, les abaissements de fréquence de la bande ν(C=O) de l'amide en présence d'acide acétique atteignent 50 cm^{-1}, alors qu'avec les halogénoformes ou les alcools la formation de complexe I (ou B) ne provoque que des perturbations de 15 à 25 cm^{-1}. Ainsi, la liaison hydrogène est, comme on l'attend, beaucoup plus forte avec le premier composé qu'avec les seconds.

1.2.2.2. - Cas des acides trichloro - et trifluoroacétiques

Les figures 8 et 9 représentent respectivement les bandes d'absortion ν(C=O) du DMA, du PP et du iBP en solution dans des mélanges acide trichloroacétique (TCA) - C_2Cl_4. Pour des fractions molaires faibles en acide, il apparaît une bande "associée" vers 1580 - 1595 cm^{-1} attribuable à des groupements C=O de molécules d'amide engagées dans des complexes de type (I). Pour des fractions molaires voisines de 0,05, la plupart des molécules d'amide sont complexées. Au-dessus de cette valeur, des complexes de type (C) sont bien mis en évidence dans le cas de l'iBP surtout (bande à 1552 cm^{-1}, fig. 9B) et à un degré moindre avec le PP (bande à 1564 cm^{-1}, fig. 9A) ; ils n'existent pas dans le cas du DMA (fig. 8).

Quand la fraction molaire de l'acide atteint et dépasse 0,2, l'allure du spectre change, ce qui n'était pas observé avec l'acide acétique. Il apparaît, à des fréquences plus élevées que celles des bandes ν(C=O)"associées", deux nouvelles absorptions dont l'intensité croît avec le taux en acide. Dans le cas du PP, elles sont situées vers 1660 et 1610 cm^{-1}, dans celui du DMA, la plus haute est observée vers 1680 cm^{-1} tandis que la seconde, très peu visible, se manifeste par un épaulement vers 1600 cm^{-1}. Pour le iBP, les transformations spectrales sont moins importantes, seul un large épaulement paraît vers 1645 cm^{-1} sur la bande principale à 1552 cm^{-1}.

Des résultats analogues ont été obtenus en étudiant les mêmes amides dans des mélanges d'acide trifluoroacétique (TFA) et de chlorure de méthylène (fig. 10, 11). Outre la bande ν(C=O) de l'amide libre dans le chlorure de méthylène, on distingue sur ces différents spectres les bandes ν(C=O)

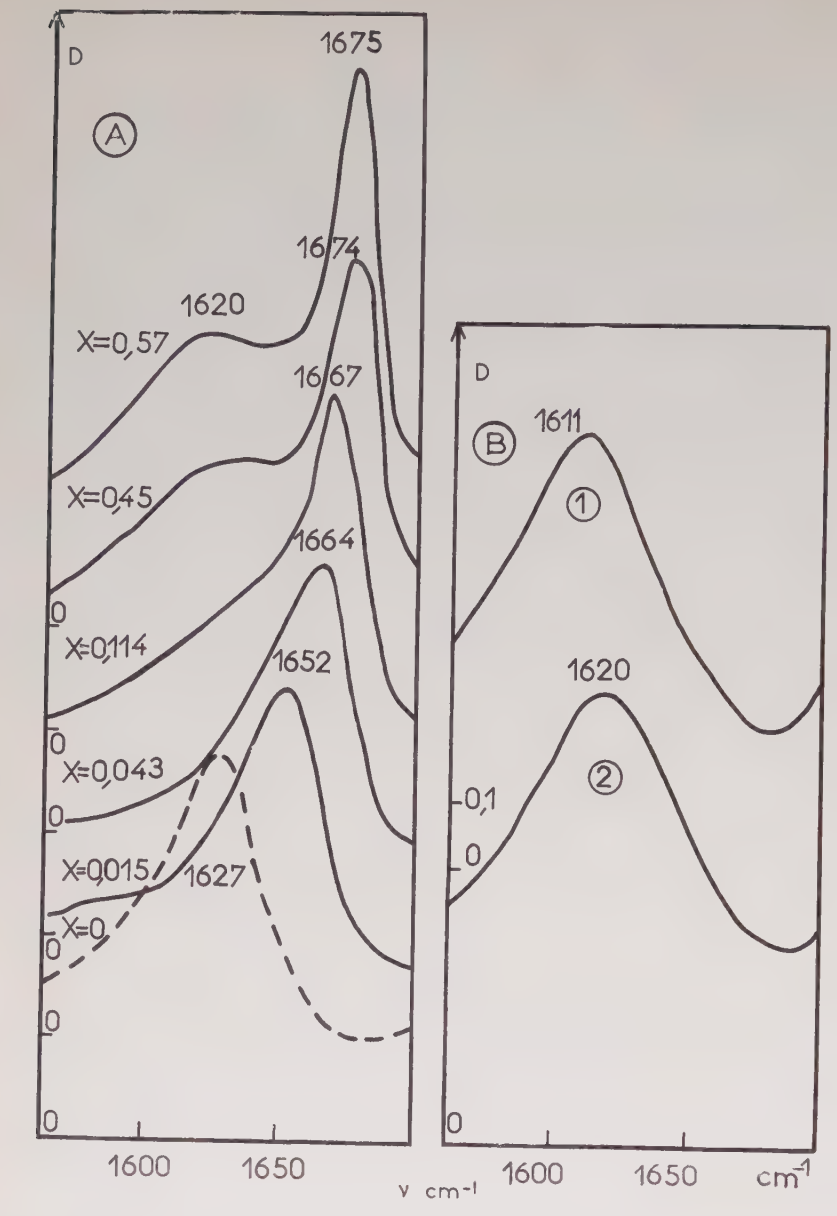


Fig. 12 (A) Etude du chlorhydrate de PP dans des mélanges CF_3COOH - CH_2Cl_2.
(B) Etude de la triéthylamine dans des mélanges :
(1) CCl_3COOH (x=0,45) - C_2Cl_4
(2) CF_3COOH (x=0,43) - CH_2Cl_2

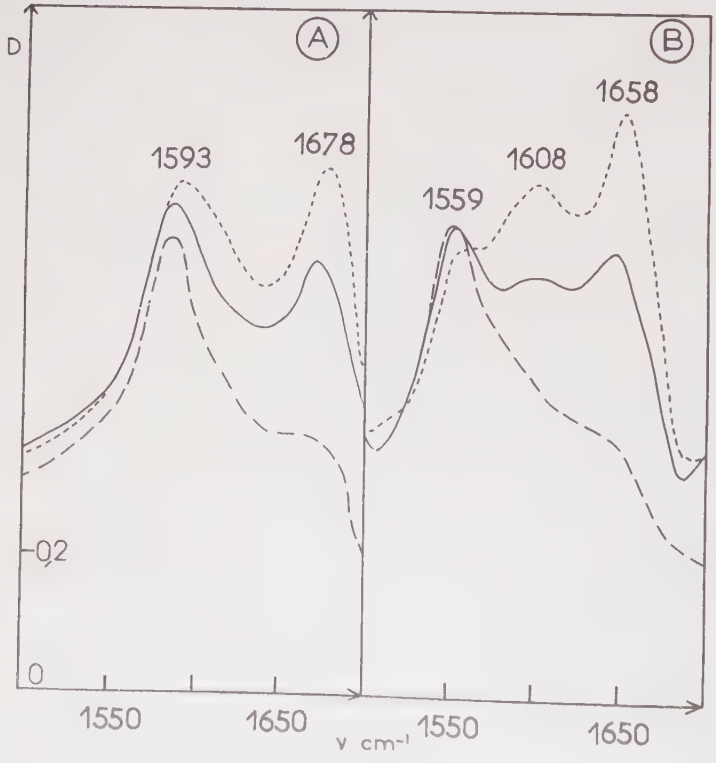


Fig. 13 Evolution avec la température (----80°C, —— 25°C,.....-5°C) de la bande ν(C = O) du DMA (A) et du PP (B) en solution dans un mélange CCl_3COOH (X = 0,35) - C_2Cl_4.

des complexes (I) entre 1575 et 1594 cm^{-1} pour les trois composés et de complexes de type (C) pour le iBP seulement vers 1550 cm^{-1}. A fortes fractions molaires en acide, on note l'apparition de nouvelles absorptions, l'une de fréquence à peu près fixe vers 1620 cm^{-1}, l'autre de fréquence variable avec l'amide : 1698 cm^{-1} pour le DMA, 1678 cm^{-1} pour le PP et 1660 cm^{-1} pour le iBP. On ne peut attribuer ces bandes à des espèces libres ou associées puisqu'elles ont été caractérisées dans les solutions faiblement acides ; nous allons voir qu'elles correspondent en réalité à l'apparition d'espèces ioniques dues au transfert de proton de l'acide carboxylique trihalogéné à l'amide selon :

$$(I)\quad \gtrless N-\underset{|}{C}=O\ldots\ldots HO-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CX_3 \;\rightleftarrows\; \gtrless N^{(+)}=\underset{|}{C}-OH,\ O\ldots\underset{(-)}{\overset{\overset{|}{\|}}{C}}-CX_3 \quad (II)$$

En effet, des échauffements thermiques importants se produisent quand on effectue les mélanges riches en acide. La bande située vers 1620 cm^{-1} dans le cas du TFA et vers 1600 - 1610 cm^{-1} dans celui du TCA est attribuée aux ions carboxylates solvatés et celle de plus haute fréquence aux ions amidiums.

On peut le montrer en étudiant, dans des mélanges TCA - C_2Cl_4 ou TFA - CH_2Cl_2, un composé plus basique que les amides et n'absorbant pas dans cette région spectrale. Nous avons reproduit sur la figure 12B les résultats obtenus avec la triéthylamine. Nous retrouvons une bande à 1610 ou 1620 cm^{-1} qui ne peut être attribuée qu'à des ions carboxylates. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'examen des spectres des trichloro - et trifluoroacétates alcalins en solution dans des mélanges de solvants identiques. Toutefois, on remarque que les fréquences sont plus faibles que celles des vibrations $\nu_a(COO^-)$ de CF_3COONa par exemple, étudié en solide (1687 cm^{-1}) (46) ou en milieu aqueux (1681 cm^{-1}) (47). Dans les mélanges que nous avons considérés, l'ion carboxylate est probablement solvaté par les liaisons hydrogène $CX_3COOH\ldots\ldots{}^-OOCCX_3$.

On voit également sur la figure 12A le spectre du chlorhydrate de propionopipéridide en solution diluée dans des mélanges d'acide trifluoroacétique et de chlorure de méthylène. En l'absence d'acide, la bande de l'ion amidium apparaît vers 1627 cm^{-1}. En présence d'acide, probablement par suite de la dissociation des ions amidium et chlorure et de l'apparition d'interactions nouvelles avec le milieu, elle s'élève progressivement jusqu'à 1675 cm^{-1} ;

c'est la fréquence à laquelle on l'observe dans les solutions de propionopipéridide (fig. 11). Dans les solutions de chlorhydrate riches en TFA apparaît également une bande vers 1620 cm^{-1} (fig. 12A) due à des ions carboxylate provenant de la réaction :

$$CF_3COOH + Cl^- \rightleftarrows CF_3COO^- + HCl$$

Nous avons obtenu des résultats analogues avec les autres couples chlorure d'amidium - acide ; on observe que les valeurs des fréquences des ions amidiums sont toujours dans l'ordre : $DMAH^+ > PPH^+ > iBPH^+$. En outre dans les mélanges, chacune d'elles varie avec le taux et la nature de l'acide carboxylique ; ceci suggère qu'il existe des interactions acide - ion amidium assez fortes.

Nous avons pu confirmer ces interprétations par l'étude de la protonation de ces amides en solution aqueuse chlorhydrique ou sulfurique (48, 49) : la bande du cation amidium, seule observée dans ces mélanges, se situe dans les mêmes domaines de fréquence. Son attribution est encore discutable ; il est probable qu'elle met en jeu principalement le mouvement de valence $\nu(C=N^+)$ comme nous l'avons indiqué précédemment. Cette hypothèse est compatible avec les travaux de COOK (32, 33) sur les sels de DMA à l'état solide. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier par exemple, le comportement de cette bande par substitution isotopique $^{14}N \rightarrow {}^{15}N$.

L'addition progressive d'acide trichloro - ou trifluoroacétique à une solution diluée d'amide dans le tétrachloroéthylène ou le chlorure de méthylène provoque donc d'abord la formation d'un "complexe externe", puis celle d'ions amidium et carboxylate . HOHMAN avait fait, par spectroscopie RAMAN, des observations suggérant également la présence simultanée d'ions et de complexes moléculaires dans des mélanges binaires TFA - DMA (45). En outre, nos résultats sont voisins de ceux obtenus par BELL et coll. avec des solutions de phénol et d'amine (37) et par NASIELSKI et coll. avec des acides carboxyliques et des dérivés monoazaaromatiques (38). Toutefois, la transformation spectrale que nous observons ne correspond probablement pas seulement à un transfert de proton du premier minimum du potentiel de la liaison hydrogène X-H....Y à l'autre, transfert qui serait provoqué par une augmentation de la constante diélectrique du milieu. C'est au moins ce que suggère l'influence de la concentration en acide sur les fréquences des ions. Peut-être faut-il considérer plusieurs "complexes externes" constitués de l'anion, du cation et d'une ou de plusieurs molécules d'acide, certaines pouvant s'interposer entre

les deux ions. On passerait ainsi progressivement d'une paire d'ions plus ou moins complexés avec le solvant aux ions libres. Le mélange de propionopipéridide, d'acide trifluoroacétique et de chlorure de méthylène est intéressant à cet égard : si pour un taux d'acide assez fort on distingue bien les bandes de l'ion amidium à 1678 cm^{-1} et de l'ion carboxylate à 1621 cm^{-1}, dans des milieux moins riches en acide, ces deux bandes semblent confondues vers 1650 cm^{-1} (fig. 11A).

Nos résultats doivent être comparés également à ceux de STEWART et coll. (42) qui ont étudié par résonance magnétique nucléaire les mélanges d'acide trifluoroacétique, d'amide et de chloroforme en fonction du taux d'acide carboxylique. Ces auteurs n'envisagent pour interpréter les déplacements chimiques que la présence de paires d'ions et d'ions libres solvatés, alors que la spectroscopie infrarouge montre également l'existence de "complexes externes" formés par liaison hydrogène entre l'acide et l'amide. Les résultats de résonance magnétique nucléaire et d'absorption infrarouge s'accordent par contre sur l'absence d'ions dans les mélanges d'acide acétique et d'amide (43).

Quel que soit l'état de solvatation des ions carboxylate et amidium dans nos mélanges, nous avons voulu vérifier que le passage du "complexe externe" aux ions était bien un phénomène réversible, en étudiant l'influence de la température. La figure 13 présente les spectres que nous avons obtenus pour le DMA et pour le PP dans des mélanges d'acide trichloroacétique et de tétrachloroéthylène entre 80°C et -5°C. On voit que le PP (fig. 13B), dans le mélange étudié à 80°C, est en majeure partie sous forme complexée avec l'acide par liaison hydrogène. Le refroidissement fait apparaître les bandes de l'ion carboxylate à 1608 cm^{-1} et de l'ion amidium vers 1658 cm^{-1} qui deviennent prépondérantes à -5°C. Un réchauffement redonne le spectre initial. Le même phénomène est observé avec le DMA (fig. 13A) ; son analyse est seulement un peu plus difficile, car il y a une superposition des bandes ν(C=O) de l'amide complexé (I) et de l'ion carboxylate vers 1600 cm^{-1}. L'effet marqué de température que nous avons observé est en accord avec le fait que l'ionisation dans ces solutions est un phénomène fortement exothermique.

1.2.3. - Interaction polyacrylamide - acides carboxyliques

Les figures 14 et 15 reproduisent les résultats obtenus avec le polyacrylopipéridide. On voit que l'addition d'acide fait disparaître dans chaque cas la bande ν(C=O) "libre" du polymère vers 1635 cm^{-1} au profit d'une bande ν(C=O) "associée" dont la fréquence varie entre 1585 et 1600 cm^{-1} selon la nature de l'acide. En milieu riche en acide, tous les groupements C=O

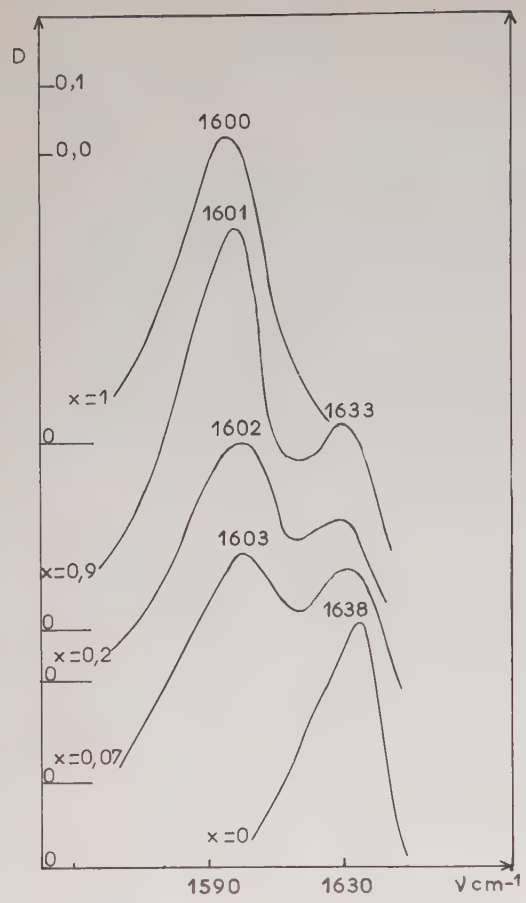


Fig. 14 Evolution de la bande ν(C = PAP dans des mélanges CH_3COO C_2Cl_4 (x : fractions molaire d'acide).

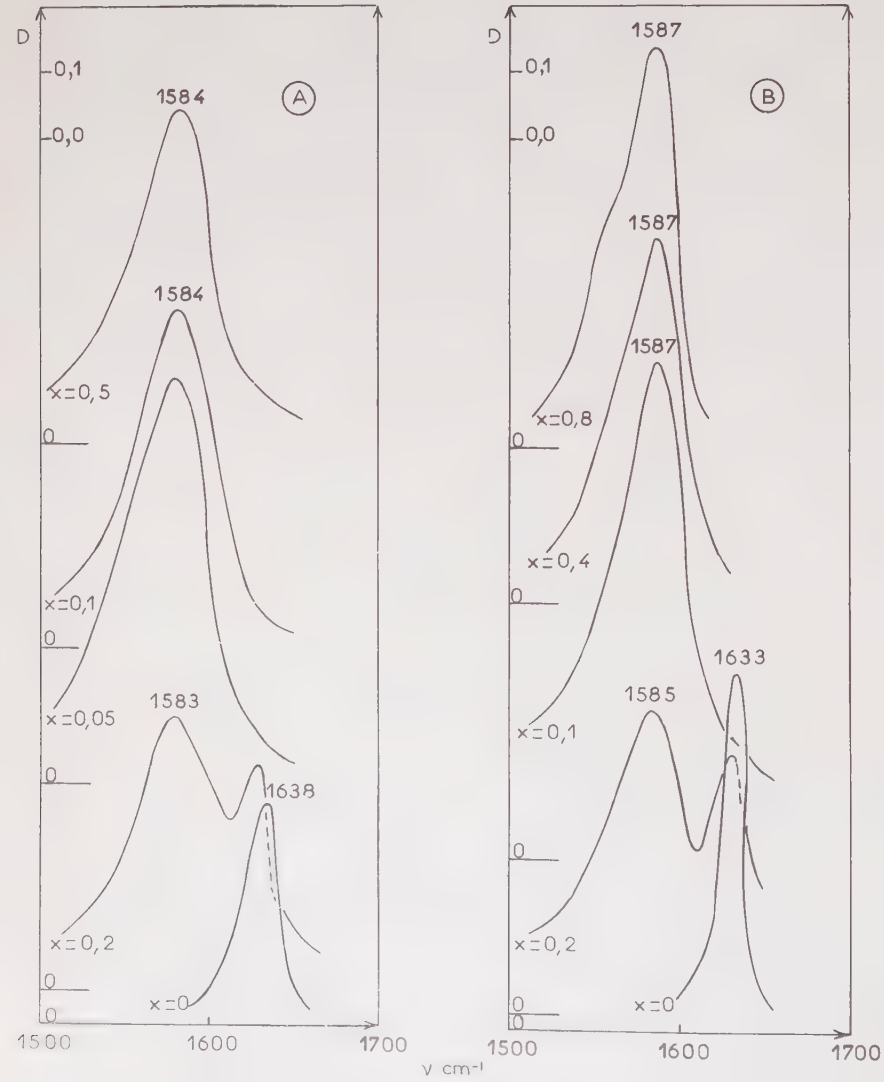


Fig. 15 Evolution de la bande de ν(C = O) du PAP dans des mélanges (A) : CCl_3COOH - C_2Cl_4 et (B) : CF_3COOH - CH_2Cl_2 (x : fractions molaires d'acide).

sont complexés (I). La faible basicité relative du polymère est bien mise en évidence par la comparaison des $\Delta\nu$ d'association relatifs à ces complexes (I) pour les composés modèles et le polymère : ces valeurs sont en effet respectivement pour le PP, le iBP et le PAP, de 45, 45 et 38 cm^{-1} avec l'acide acétique, de 75, 61 et 54 cm^{-1} avec l'acide trichloroacétique et de 63,58 et 46 cm^{-1} avec l'acide trifluoroacétique. Notons que la basicité intermédiaire de l'isobutyropipéridide qui apparaît ainsi, se manifeste aussi dans l'allure de la protonation de cet amide (fig. 9).

Par ailleurs, et c'est là le fait le plus important, on n'observe pas, dans les milieux riches en acide trichloro - ou trifluoroacétique, le phénomène de protonation des fonctions amide du PAP : aucune des deux bandes caractéristiques des ions carboxylate et amidium n'apparaît. Ceci est cohérent avec la diminution de basicité due aux interactions dipolaires entre groupes C=O du PAP, diminution probablement encore accentuée dans le cas présent si un site basique de la macromolécule se trouve protoné, en raison de l'effet de charge pouvant se répercuter sur ses voisins.

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

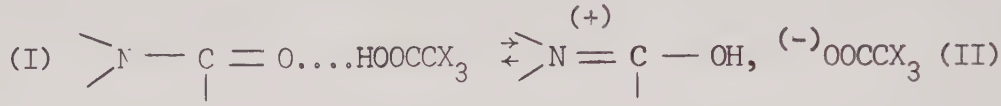
Dans cette première partie, nous avons tenté d'évaluer le caractère accepteur de proton d'un polyacrylamide N-disubstitué : le polyacrylopipéridide. Cette espèce macromoléculaire est une polybase généralisée au sens de Lewis, caractérisée par la présence, dans chaque motif monomère, d'une fonction acceptrice de proton et par l'absence d'atome d'hydrogène acide.

Pour cela nous avons tout d'abord comparé systématiquement, dans les solvants moyennement donneurs de proton (alcools, halogénoformes), l'état de solvatation des fonctions carbonyle du polymère et de molécules simples reproduisant partiellement sa séquence de répétition. Nous avons ainsi constaté que le groupement amide des chaînes de polymère est beaucoup moins sensible à l'influence du solvant que celui des molécules modèles. Cette basicité moindre se traduit par une moins bonne aptitude à former des complexes par liaison hydrogène : alors que l'on peut mettre en évidence des formes associées de type 1 : 1 $\geq N-\underset{|}{C}=O\ldots HX$ et 1 : 2 $\geq N-\underset{|}{C}=O\begin{matrix}\cdot\cdot\cdot HX\\ \cdot\cdot\cdot HX\end{matrix}$ avec les amides tertiaires modèles, on ne distingue que le premier type de complexation dans le cas du polyamide. Cette association s'effectue en outre difficilement et il est nécessaire d'utiliser des solvants très acides pour qu'elle atteigne la totalité des sites basiques des chaînes.

Cette différence de comportement a pu être précisée quantitativement par la détermination des grandeurs thermodynamiques caractéristiques des associations de ces amides et polyamide avec des réactifs électrophiles (iode, phénols). Les valeurs des constantes de stabilité K_1 sont, par exemple, deux fois plus faibles pour chaque séquence macromoléculaire que pour chacune des deux molécules prises comme modèles.

Par ailleurs, l'étude de l'interaction de ces composés avec des solvants donneurs de proton assez forts comme les acides carboxyliques a permis de montrer l'existence de diverses formes d'interactions. Ainsi les systèmes

amide - acide acétique ne donnent lieu qu'à des complexes par liaison hydrogène de type 1 : 1. Par contre les systèmes amide - acides trichloro - et trifluoroacétiques fournissent, pour des solutions faiblement ou moyennement acides, des complexes 1 : 1 et quelquefois 1 : 2 ; pour des solutions plus concentrées en acide apparaissent des formes ioniques, résultat d'un transfert de proton de l'acide au goupe OCN, en équilibre avec les complexes par liaison hydrogène selon :



(I) $\rightleftarrows$ (II)

L'existence des paires d'ions et des ions solvatés par le milieu acide a été caractérisée par deux bandes d'absorption typique chacune de l'espèce amidium ($\nu C{=}\overset{+}{N}$) et de l'espèce carboxylate ($\nu_a COO^-$). Ces systèmes amide - acide constituent de bons exemples du passage progressif de la liaison hydrogène à la forme ionique. Les mêmes spectres effectués avec le polyacrylopipéridide montrent qu'il n'y a pas protonation et qu'il y a apparition seulement des formes associées (I) ; ceci confirme la faible basicité relative des groupements amide du polymère et constitue aussi un résultat intéressant pour l'étude qui va suivre concernant les polypeptides.

Parmi les différents facteurs qui régissent le caractère basique peu prononcé du polyacrylopipéridide et qui sont liés aux conformations adoptées par le polymère en solution, il a été possible de mettre en évidence un effet dipolaire entre fonctions carbonyle appartenant à une même chaîne macromoléculaire ; ces interactions entre sites basiques peuvent sensiblement atténuer leur pouvoir donneur d'électrons. Cet effet est d'autant plus marqué que l'un des sites se trouve déjà engagé dans un complexe avec le milieu donneur de proton, ou mieux encore s'il est protoné. Dans ce dernier cas, en effet, la protonation du site peut, par effet de charge, empêcher celle de ses voisins.

La méthode d'étude comparative que nous avons utilisée constitue une technique intéressante d'analyse des propriétés acido - basiques d'une chaîne macromoléculaire et va nous permettre d'aborder plus aisément l'étude des polypeptides.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA SOLVATATION DES POLYPEPTIDES PAR LES SOLVANTS DONNEURS DE PROTON AU COURS DE LEUR TRANSFORMATION DE CONFORMATION HELICE - CHAINE STATISTIQUE

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES POLYPEPTIDES EN SOLUTION

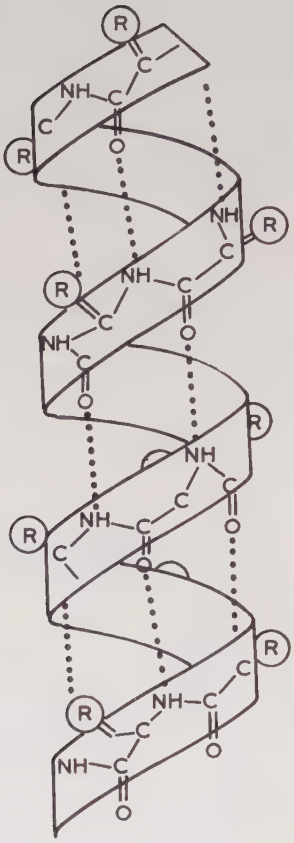
2.1.1. - Conformations des polypeptides en solution

Les polypeptides, de formule générale $-\left[CO-CHR-NH\right]_n-$ sont susceptibles d'adopter diverses conformations à l'état solide, parmi lesquelles les plus courantes sont l'hélice α, la structure β et la pelote statistique. A l'état dissous, certaines d'entre elles sont défavorisées ; il en est ainsi de la structure β qui, bien qu'envisagée dans certains cas (50 à 53) est beaucoup moins probable que la conformation hélicoïdale. Cette dernière est généralement de type α, c'est-à-dire que ses caractéristiques géométriques sont voisines de celles définissant la structure α hélicoïdale initialement proposée par PAULING et coll. (54) et pour laquelle un réseau de liaisons hydrogène C=O....H - N formées entre unités de rang i et i + 4 assure la cohésion de l'édifice (fig. 16). Dans cette conformation, on remarque que l'alignement des atomes C, O, N des deux groupes amide participant à la liaison hydrogène, assure à celle-ci une stabilité maximale. Elle est commune à un grand nombre de polypeptides dont le résidu amino-acide : - CO - CHR - NH est optiquement actif et peut, selon les cas, s'enrouler à droite ou à gauche.

La structure (ordonnée ou désordonnée) adoptée par un polypeptide en solution résulte de la combinaison des interactions intramoléculaires entre motifs de la chaîne et des interactions intermoléculaires chaîne - milieu environnant. Selon l'importance de ces dernières, les liaisons hydrogène stabilisant l'hélice α pourront, ou non, subsister. C'est ainsi que les solvants

3,67 résidus par tour

pas : 5,4 Å



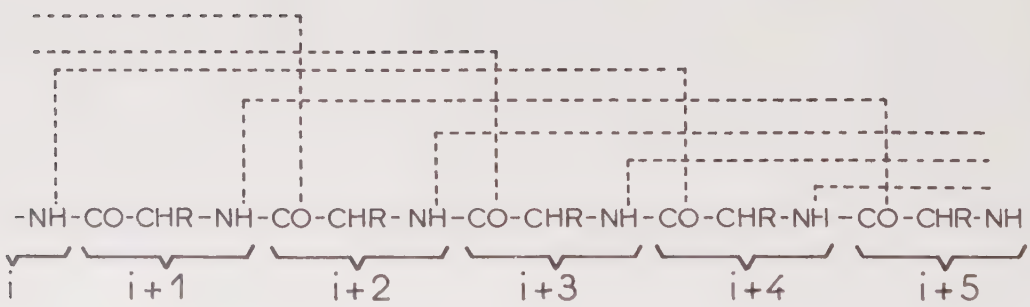


Fig. 16 Représentations schématiques de l'hélice α de PAULING et coll. (54).

peu polaires (chloroforme, dichloroéthane...) favorisent l'hélice α, les solvants plus polaires (acides carboxyliques...), la forme pelote statistique. Parmi les facteurs propres au polymère, influant sur sa conformation, citons la nature de l'amino-acide, la masse moléculaire de l'échantillon (6 à 12 résidus au minimum sont nécessaires pour que l'hélice α puisse se former), le signe de l'activité optique du résidu, l'incorporation ordonnée ou statistique d'isomères optiques dans une même chaîne etc...

2.1.2. - Techniques physicochimiques d'étude de la conformation des polypeptides en solution

Diverses méthodes permettent d'identifier la structure des polypeptides en solution. Citons les spectroscopies IR, UV, RMN, les techniques utilisant le pouvoir rotatoire de la macromolécule, soit la dispersion optique rotatoire (ORD) et le dichroïsme circulaire (CD). Toutes différencient l'hélice de la pelote et certaines sont en outre susceptibles de donner des renseignements quantitatifs tels que le taux d'hélicité dans le cas de mélanges conformationnels. Par ailleurs, notons que la viscosimètrie et la diffusion de la lumière sont des méthodes globales plus spécialement appropriées à l'obtention de renseignements sur la masse, la dimension et la forme des chaînes en solution.

Nous développerons plus particulièrement la spectroscopie infrarouge et la dispersion optique rotatoire qui seront utilisées dans la suite de ce travail.

Par spectroscopie infrarouge, il est possible, d'après les fréquences des bandes du groupement amide, de tirer des informations structurales. En effet,certaines, telles que les bandes amide A, I et II mettant en jeu les mouvements d'élongation ou de déformation des liaisons NH, CO, CN, sont particulièrement sensibles à l'état d'interaction des groupes correspondants et par conséquent à la conformation du résidu amino-acide. Les corrélations fréquence - conformation sont plus faciles à obtenir d'après les études effectuées à l'état solide qu'en solution. Dans ce dernier cas, en effet, il y a des problèmes techniques (transparence du solvant, solubilité du polymère etc...) et d'interprétation des effets de solvants. Toutefois, dans un certain nombre de cas simples, on peut différencier avec certitude les diverses formes et en particulier les hélices α droite ou gauche et la pelote (tableau V).

Tableau V : Valeurs extrêmes (en cm^{-1}) de quelques fréquences de vibration du groupement amide de polypeptides dans diverses conformations (113)

Structure en solution		Amide A	Amide I	Amide II
Helice α	D	3285 - 3287	1651 - 1657	1549 - 1556
	G	3298	1668 - 1675	1560
Pelote			1675 - 1685	

Par spectroscopie infrarouge, il est difficile d'obtenir le taux d'hélicité des chaînes en solution ; or cette donnée est particulièrement intéressante comme nous le verrons par la suite. On fait alors appel à la dispersion optique rotatoire ou variation du pouvoir rotatoire α_λ en fonction de la longueur d'onde λ .

La dispersion optique rotatoire d'un composé optiquement actif contenant un chromophore absorbant à la longueur d'onde λ_a comprend en général deux domaines : un de rotation "normale" pour des longueurs d'onde éloignées de λ_a et un de rotation "anormale" pour des longueurs d'onde voisines de λ_a, pour lequel le pouvoir rotatoire subit une variation brusque en fonction de λ (effet Cotton). La dispersion optique rotatoire est basée sur l'étude de la rotation "normale". En ce qui concerne les polypeptides, le pouvoir rotatoire résulte d'une part, de la rotation due au résidu amino - acide et d'autre part, de celle due à l'asymétrie de la structure secondaire (55).

Diverses relations semi - empiriques ont été proposées pour interpréter les résultats de la dispersion optique rotatoire des polypeptides en solution et évaluer le degré d'ordre des chaînes. Celle de MOFFITT et coll. (56, 57) est la plus couramment utilisée et rend assez bien compte des formes α hélicoïdale et désordonnée. Selon ces auteurs, la dispersion des polypeptides en solution est représentée par :

$$[m']_\lambda = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \qquad |1|$$

$[m']_\lambda$: pouvoir rotatoire spécifique moyen par résidu, déterminé à partir de la mesure de α_λ

λ_0 : paramètre choisi

a_0, b_0 : coefficients déterminés graphiquement à partir de |1|. Le premier, a_0, représente à la fois les rotations intrinsèques par résidu et les interactions à l'intérieur de l'hélice ; sa valeur varie avec l'environnement et la structure du polymère (58). Le second, b_0, est essentiellement fonction de la structure secondaire du polypeptide et sa valeur est insensible à l'environnement ou à la nature du substituant latéral (57). Ainsi pour la conformation α hélicoïdale, on admet que b_0 est voisin de ± 630 (hélice droite (-) hélice gauche (+)), alors que pour la forme désordonnée, b_0 est pratiquement nul. Ces valeurs sont utilisées comme références pour le calcul du pourcentage de chaînes en hélice (θ) des polypeptides en solution, en supposant que b_0 est une fonction linéaire de θ ; soit pour l'hélice α droite :

$$\theta = \frac{-b_0 \text{ (observé)}}{630} \times 100 \qquad |2|$$

2.1.3. - La transformation hélice α - chaîne statistique

Nous avons vu que certains solvants favorisent la forme hélicoïdale, d'autres la forme pelote statistique. Il est possible d'obtenir, pour un polypeptide particulier, le passage de l'une à l'autre forme en faisant varier certains paramètres caractéristiques du milieu (composition, température...).

Ce phénomène connu sous le nom de transition "hélice α - chaîne statistique" est caractérisé par l'étroitesse du domaine de transformation (en composition du mélange de solvants ou en température) au cours duquel il se produit. Il a été extrêmement étudié par le passé aussi bien d'un point de vue théorique qu'expérimental en raison des informations intéressantes que l'on peut espérer en tirer pour des molécules plus complexes telles que les protéines.

Les paramètres physicochimiques les plus couramment utilisés pour suivre la transition hélice - pelote sont : la grandeur b_0 de l'équation |1|en ORD et la viscosité $[\eta]$. Notons toutefois que les propriétés globales ainsi mesurées ne permettent pas de dégager les interactions spécifiques qui sont plus facilement atteintes au moyen de la spectroscopie infrarouge par exemple.

L'étude de la transition des polypeptides insolubles dans l'eau, comme ceux qui seront choisis dans ce travail, est effectuée dans des mélanges binaires de solvants dont l'un est hélicogène et l'autre un donneur de proton assez fort. On peut faire varier soit la température du mélange de solvants, soit sa composition, pour obtenir la transformation ; la stabilité de l'hélice est alors indiquée par une température de transition ou par un rapport de concentrations en solvants.

Les études antérieures ont permis de classer les chaînes latérales des acides aminés en fonction de la stabilité hélicoïdale des polyaminoacides correspondants ; toutefois on ne comprend pas encore bien le rôle joué par les chaînes latérales dans la cohésion des hélices.

2.1.4. - Rappels thermodynamiques sur le phénomène de transition hélice-pelote

Depuis la mise en évidence, par DOTY et coll. (59),de la transition hélice - pelote de certains polypeptides en solution, divers travaux théoriques utilisant un modèle simple ont été publiés dans le but d'étudier les aspects thermodynamiques de ce phénomène.

Une macromolécule simple possédant une structure secondaire peut être comparée à un cristal monodimensionnel. Comme lui, elle peut subir une transition étroite sous l'effet d'un changement de température ou de composition du solvant. Une telle transition est alors semblable à une transition de phase, à une "fusion" d'un système ordonné à une dimension en un système désordonné typique des macromolécules ordinaires.

D'un point de vue physique, la transformation hélice - pelote rend compte du fait que l'état de la macromolécule dans laquelle les unités monomères prennent part à des liaisons hydrogène intramoléculaires est favorisé énergétiquement alors que l'état libre de la macromolécule est, lui, favorisé entropiquement du fait de sa flexibilité. Les énergies libres de ces deux états varient de différentes manières avec la température ou la composition du mélange de solvants. Lorsqu'elles s'égalisent, on définit, par exemple, la température de transition.

Comme nous l'avons vu, la liaison hydrogène de l'hélice α qui se forme entre éléments de rang i et i + 4 n'existe que si les trois éléments i + 1, i + 2, i + 3 sont sous forme hélicoïdale (60). Réciproquement, dans une séquence hélicoïdale, l'obtention de degrés de liberté conformationnelle n'est possible que si au moins trois unités consécutives ne possèdent plus de liaison hydrogène (61). Donc l'état d'un élément monomère dépend de l'état des éléments voisins. On en déduit le caractère coopératif de la transition qui se traduit par l'étroitesse de l'intervalle dans lequel elle se produit.

Ces considérations permettent de définir deux paramètres statistiques caractéristiques de la transition. Dans le formalisme de ZIMM et coll. (62) qui est le plus couramment employé, ce sont σ et s. Ils déterminent respectivement la nucléation et la croissance de l'hélice, soit plus précisément :

- σ définit quantitativement le caractère coopératif de la transition ; il caractérise la difficulté de formation du premier tour de l'hélice qui fige la conformation de trois résidus. Sa signification thermodynamique est alors principalement entropique : $\sigma \simeq \exp [\Delta S/R] < 1$ (car $\Delta S << 0$). Le système est d'autant plus coopératif que σ est petit. Signalons que certains auteurs (63, 64, 65) introduisent aussi dans l'expression de σ une contribution enthalpique.

- s peut être considéré comme la constante d'équilibre relative à la réaction d'incorporation d'un nouvel élément monomère à une séquence hélicoïdale, selon :

....hhccc ..... $\overset{\rightarrow}{\leftarrow}$ .....hhhcc.... |3|

Sa valeur est fonction des grandeurs thermodynamiques caractéristiques de la formation d'une liaison hydrogène à l'extrémité d'une séquence hélicoïdale, soit $s = \exp [\Delta S°/R - \Delta H°/RT]$.

Ces paramètres dépendent du couple polypeptide - solvant ; en particulier on a montré (66) que divers facteurs influent sur la valeur de α (nature de la chaîne latérale, solvant, température, degré de polymérisation...). Ils peuvent être reliés à la fraction θ de liaisons hydrogène intramoléculaires obtenue expérimentalement par ORD, par exemple. Divers auteurs (61, 62, 67) ont donné un traitement thermodynamique et statistique de la transition par voie thermique d'une chaîne polypeptidique de longueur infinie ou variable selon un modèle adapté aux caractéristiques géométriques de l'hélice α. Les courbes $\theta = f(s)$ mettent en évidence l'étroitesse du domaine de transformation autour de la valeur $s=1$, selon les valeurs choisies de σ (61, 62).

Dans la plupart de ces derniers travaux, il n'est pas tenu compte de manière explicite du rôle du solvant. L'influence d'un tel facteur externe sur la transition hélice - pelote a été traitée plus précisément par SCHELLMAN (68), GŌ et coll. (63), PELLER (69), GIBBS et coll. (70).

Considérons donc, selon PELLER (69), l'influence du solvant sur la transition. Le polymère hélicoïdal est en solution dans un mélange binaire de solvants : l'un S est inerte, l'autre A qui est actif (donneur de proton du type urée, acide carboxylique...) est susceptible de former des liaisons hydrogène avec les sites accepteur ou donneur de proton accessibles du polymère ; ces derniers sont les groupes CO et NH des résidus peptidiques simplement liés (extrémités d'hélices) ou pas liés du tout (portions en pelote). Cette interaction va influencer les conditions d'équilibre conformationnel du polypeptide, à savoir le nombre des résidus en hélice et en pelote. Il est important de noter que, au contraire de la formation de la liaison hydrogène intramoléculaire, l'association avec le solvant n'est pas coopérative, c'est-à-dire qu'elle se fait, en première approximation, indépendemment dans des unités monomères voisines et suit la loi simple d'action des masses.

PELLER ne distingue pas, dans le calcul, les constantes d'association des sites CO et NH avec le solvant A. Il montre que la constante K relative à l'équilibre :

$$\text{solvant A} + \text{polymère} \rightleftarrows \text{polymère - solvant A} \qquad |4|$$

vérifie la relation $K = \frac{m}{a(M-m)}$ |5|

où M désigne le nombre total de sites CO et NH pouvant interagir, m, le nombre de sites associés à A et a, l'activité de ce dernier.

La variation d'énergie libre totale (ΔF) pour le polymère en mélange S.A est la somme de celle évaluée en absence de A (ΔF_S) et de celle consécutive à l'interaction |4| (ΔF_b), soit :

$$\Delta F = \Delta F_S + \Delta F_b \qquad |6|$$

C'est une expression complexe qui permet toutefois d'obtenir des quantités intéressantes, en particulier la fraction de résidus en forme pelote $X_c = 1-\theta$, fonction de paramètres propres à la chaîne (s, σ) et au milieu extérieur (a, T). On montre alors qu'il est possible d'induire la transition hélice - pelote par association préférentielle, d'une manière coopérative, en faisant varier la composition du mélange de solvants. En effet, si l'on se donne une valeur correcte pour chacun des autres paramètres, on calcule une courbe $X_c = f(a)$ (fig. 17) montrant que par additions successives de A, on passe d'une conformation principalement hélicoïdale, à un état désordonné. On remarque que le domaine de concentration en solvant actif pour lequel est obtenue la transformation est étroit, comme l'intervalle de température de la transition obtenue par voie thermique (61, 69). Au point milieu de la transition $X_c = \theta = 1/2$, $a = a_t$, PELLER obtient la relation :

$$s^* = s(1 + Ka_t)^2 = 1 \qquad |7|$$

dans laquelle s est la constante définie par l'équation |3|. La transition a lieu autour de la valeur $s^* = 1$ et on retrouve ainsi la condition d'équilibre de ZIMM et coll. (62) : $s = 1$, mais avec un paramètre s modifié par l'interaction avec le milieu. Cette relation montre que a_t est inversement proportionnel à K : ainsi, à température constante, l'obtention de la transition nécessite une quantité d'autant plus forte de solvant actif que celui-ci s'associe plus faiblement à la chaîne.

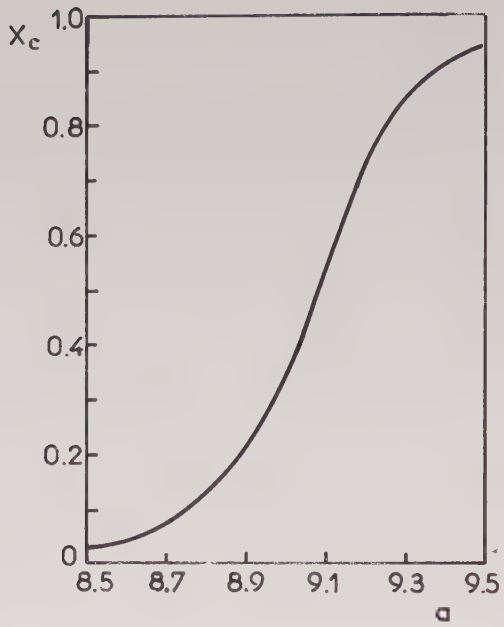


Fig. 17 Fraction de résidus en pelote (X_c) en fonction de l'activité (a) du solvant complexant, d'après PELLER (69).

En tenant compte de ce qui précède, on peut réexaminer le problème de la transition thermique. En absence de A, la température de transition endothermique est définie par :

$$T_t^\circ = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ} \qquad |8|$$

(ΔH°, ΔS° grandeurs molaires pour l'équilibre hélice - pelote en milieu inerte). En présence de A, le calcul de la variation de X_c avec la température ($\frac{dX_c}{dt}$) montre qu'elle a le signe de la quantité :

$$\Delta H^\circ + \frac{2\ Ka}{1+Ka}\ \Delta H_b \qquad |9|$$

ΔH_b désignant l'enthalpie d'interaction polymère - solvant A. Trois cas peuvent se présenter :

- K ou a est nul, la quantité |9| se réduit à $\Delta H^\circ > 0$; la conversion hélice-pelote est alors endothermique.

- K et a sont différents de zéro mais pas suffisamment grands pour que le terme en ΔH_b de |9| qui est négatif l'emporte sur ΔH° positif. Le signe de $\frac{dX_c}{dt}$ est positif, la fraction de résidus en pelote augmente avec la température comme dans le cas précédent. Toutefois on montre que la température de transition T_t est telle que :

$$T_t^\circ - T_t \simeq \frac{RT_t^{\circ 2}}{\Delta H^\circ} (2K) (a_t) \qquad |10|$$

Si l'on ignore la dépendance de K avec la température, on voit que $T_t^\circ - T_t > 0$ varie directement avec a_t, c'est-à-dire que le solvant complexant abaisse la température de fusion de façon proportionnelle à sa concentration dans le milieu. (Signalons que l'expression |10| est similaire à celle de la cryoscopie). C'est le cas de l'interaction avec des donneurs de proton de force moyenne comme l'urée, par exemple.

- K et a sont tels que dans la quantité |9| le terme en $\Delta H_b < 0$ l'emporte sur $\Delta H^\circ > 0$; l'expression entière est alors négative et la fraction de résidus en pelote diminue, dans ce cas, lorsque la température croît. L'interaction du solvant complexant avec le polymère est particulièrement forte et les caractéristiques thermodynamiques de la transition s'en trouvent profondément modifiées. En effet les grandeurs :

$$\Delta H = \Delta H^\circ + \frac{2Ka}{1+Ka} \Delta H_b \quad |11| \text{ et } \Delta S = \frac{\Delta H}{T_t} \qquad |12|$$

sont alors négatives et, dans ces conditions, la conversion hélice - pelote est exothermique ou "inversée". C'est le cas le plus courant de l'interaction avec les acides carboxyliques α halogénés. Par ailleurs on montre que la température de transition augmente lorsque a croît.

Dans ce type de transition "inversée", on remarque que l'hélice est énergétiquement moins favorable que la pelote mais entropiquement plus favorable. Ce résultat serait difficile à expliquer si l'on ne tenait pas compte de l'effet du solvant. L'entropie de la macromolécule elle-même doit croître au cours de la transition et non diminuer. Une telle augmentation peut, toutefois, être compensée par une diminution d'entropie due à la formation des liens

polymère - solvant entraînant un changement simultané de structure de ce dernier. Ceci est important et montre que lors de la détermination des paramètres thermodynamiques de la transition, la variation de conformation du polymère est associée aux changements de structure du solvant, la grandeur expérimentale mesurée étant la somme de ces deux effets.

2.1.5. - Résultats expérimentaux concernant le mode d'interaction polypeptide - acide

Si à l'heure actuelle,un grand nombre de données expérimentales ont pu être rassemblées sur le phénomène de transition hélice - pelote, leur interprétation au niveau du mécanisme de la transformation pose encore quelques problèmes.

Comme nous l'avons vu, la théorie thermodynamique de la transition est conduite à partir d'un modèle dans lequel le milieu acide interagit par formation de liens hydrogène avec les sites accessibles du polypeptide. Toutefois, une controverse ancienne,mais encore actuelle, existe sur ce mode d'interaction. Pour un grand nombre d'auteurs (71 à 83) en effet, et notamment KLOTZ et son école (71 à 74, 76 , 82), l'acide forme plutôt avec les chaînes en hélice des ions amidium et acétate par protonation des fonctions amide des chaînes. Les travaux correspondants ont été réalisés par diverses techniques : viscosimétrie (79), RMN (76 à 78, 81), conductimétrie (82, 83), biréfringence électrique (83), spectroscopie infrarouge (71 à 75). La destabilisation de l'hélice des polypeptides fait intervenir dans ces conditions divers mécanismes d'interaction selon les auteurs (interactions ioniques, ions - acide, complexes par liaison hydrogène etc...) ; mais quelque soit le processus envisagé, la protonation au moins partielle des chaînes en constitue le point de départ. D'autres auteurs (42, 84 à 89) ont toutefois mis en doute ces conclusions, en particulier par des études RMN(42, 84 à 86, 89), certains ayant, en outre, suggéré plutôt l'existence de ponts hydrogène polymère - acide (42, 85, 86, 89).

2.1.6. - Intérêt d'une étude par spectroscopie infrarouge de la transformation hélice - pelote

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce mémoire, la spectroscopie de vibration est bien adaptée à l'étude des phénomènes d'interaction par liaison hydrogène et par protonation. Les auteurs qui jusqu'ici l'ont utilisée pour analyser l'interaction polypeptide - acide se sont placés,

comme KLOTZ, (71 à 74) dans la région spectrale de l'harmonique 2ν(NH) des polypeptides, d'interprétation délicate, ou ont étudié la vibration amide I (75, 85, 90 à 94) mais de manière très fragmentaire. Les conclusions qui ont été tirées sont ainsi très diverses.

Par ailleurs, quand on examine l'ensemble des publications théoriques et expérimentales se rapportant à la transition hélice - pelote on constate que, en dépit d'un effort certain pour analyser l'influence de la nature de la chaîne latérale sur les caractéristiques hélicoïdales des polypeptides (géométrie de l'hélice, sens d'enroulement, stabilité...), on ne connaît pas encore le rôle joué par ces chaînes dans le processus de déstabilisation de l'hélice. Or parmi elles, certaines, assez longues, comportent des fonctions relativement polaires telles que les fonctions ester, thioéther, etc... Il peut être intéressant d'étudier leur comportement vis à vis du milieu acide au cours de la transition, de la même manière que l'on examine celui de la chaîne principale peptidique.

* *

*

Nous consacrerons un chapitre de cette deuxième partie à l'examen des spectres infrarouges d'un polypeptide à chaîne latérale simple (poly-L-alanine) en solution dans des mélanges acides, connus pour provoquer sa transformation de structure secondaire. L'analyse spectrale aura pour but de caractériser le mode d'interaction spécifique polymère - acide et sera menée par comparaison avec le comportement d'un amide secondaire : le N-méthylacétamide, dans les régions spectrales des vibrations fondamentales amide et acide sensibles aux phénomènes d'interaction. Dans un autre chapitre, nous étudierons la transition hélice - pelote de divers polypeptides à chaînes latérales polaires (cf. tableau VI). Tout en essayant de mettre en évidence les caractéristiques de cette transition (coopérativité, réversibilité etc...) ainsi que l'influence de divers paramètres macromoléculaires sur son obtention (degré de polymérisation, sens d'enroulement de l'hélice, activité optique du résidu etc...) nous tenterons de vérifier les hypothèses de la théorie

de PELLER sur la transition induite par association préférentielle et concernant la localisation des sites CO et NH capables d'interagir avec l'acide. Nous essaierons aussi d'analyser le comportement des chaînes latérales polaires au cours de la transition afin de discuter leur rôle éventuel dans le mécanisme de transformation hélice - pelote, de manière parallèle à celui de la chaîne principale peptidique. Enfin, dans un dernier chapitre, nous étudierons le problème particulier de la conformation de ces polypeptides en milieu alcoolique

R

(a) principales références dans "Poly - α - amino acids" de FASMAN (95)
(b) référence (96)
(c) référence (86)
(d) référence (97)
(e) référence (98)
(f) d'après des estimations viscosimétriques ou de diffusion de la lumière.

R	CH_3	$(CH_2)_2SCH_3$	$(CH_2)_2CO_2CH_2C_6H_5$		$CH_2CO_2CH_2C_6H_5$
Nom	alanine	méthionine	γ - glutamate de benzyle		β - aspartate de benzyle
Activité optique du résidu	L	L	L	D-L (alternés)	L
Abréviation	PLA	PLM	PBLG	PBD-LG	PBLA
Sens d'enroulement de l'hélice	droit	droit	droit	gauche	gauche
Transition hélice - pelote (a)	60TFA : 40DCA 80TFA : 20$CHCl_3$	20TFA : 80DCA 50TFA : 50$CHCl_3$	8TFA : 92 $CDCl_3$ (b) 80DCA : 20$CHCl_3$	3TFA : 97$CDCl_3$ (d) 17DCA : 83$CHCl_3$ (e)	3TFA : 97 $CDCl_3$ (c) 6DCA : 94 $CHCl_3$
Masse moléculaire moyenne $\overline{M}_w$ des échantillons (f)	A ≃ 35000 B faible (≃5000)	≃ 25000	≃ 75000 et 19000 ≤ $\overline{M}_w$ ≤ 550000	≃ 16000	A faible B ≃ 150000

CHAPITRE II

ANALYSE DU MODE D'INTERACTION POLYPEPTIDE - ACIDE PROVOQUANT LA TRANSITION HELICE - PELOTE DU POLYMERE : ETUDE COMPARATIVE DE LA POLY - L - ALANINE ET D'UN AMIDE MODELE EN SOLUTION DANS DES MELANGES ACIDE TRIFLUOROACETIQUE - CHLOROFORME

La poly - L - alanine (PLA) est connue pour présenter en mélange acide trifluoroacétique (TFA) - $CHCl_3$ le phénomène de transition hélice - pelote par variation de la proportion d'acide (42, 72, 95, 106). En raison de la simplicité de la nature chimique de sa chaîne latérale, elle constitue un bon cas d'étude de l'interaction polypeptide - acide responsable de la transformation de structure. En effet comme nous l'avons vu, cette interaction dont la nature est controversée doit s'établir au niveau des fonctions peptidiques de la chaîne principale. L'interprétation des spectres sera donc facilitée par l'absence d'absorptions éventuelles dues à des groupements fonctionnels latéraux.

Les spectres infrarouges des mélanges PLA - TFA - $CHCl_3$ ont été analysés grâce aux principales vibrations fondamentales amide et acide sensibles aux interactions spécifiques.

Pour comprendre plus aisément le comportement du polymère, nous avons étudié parallèlement un composé monomère modèle (le N-méthylacétamide ou NMA) dans les mêmes conditions expérimentales ; ainsi, nous avons pu dégager les principaux types d'interaction de l'amide avec l'acide carboxylique et leurs critères d'identification.

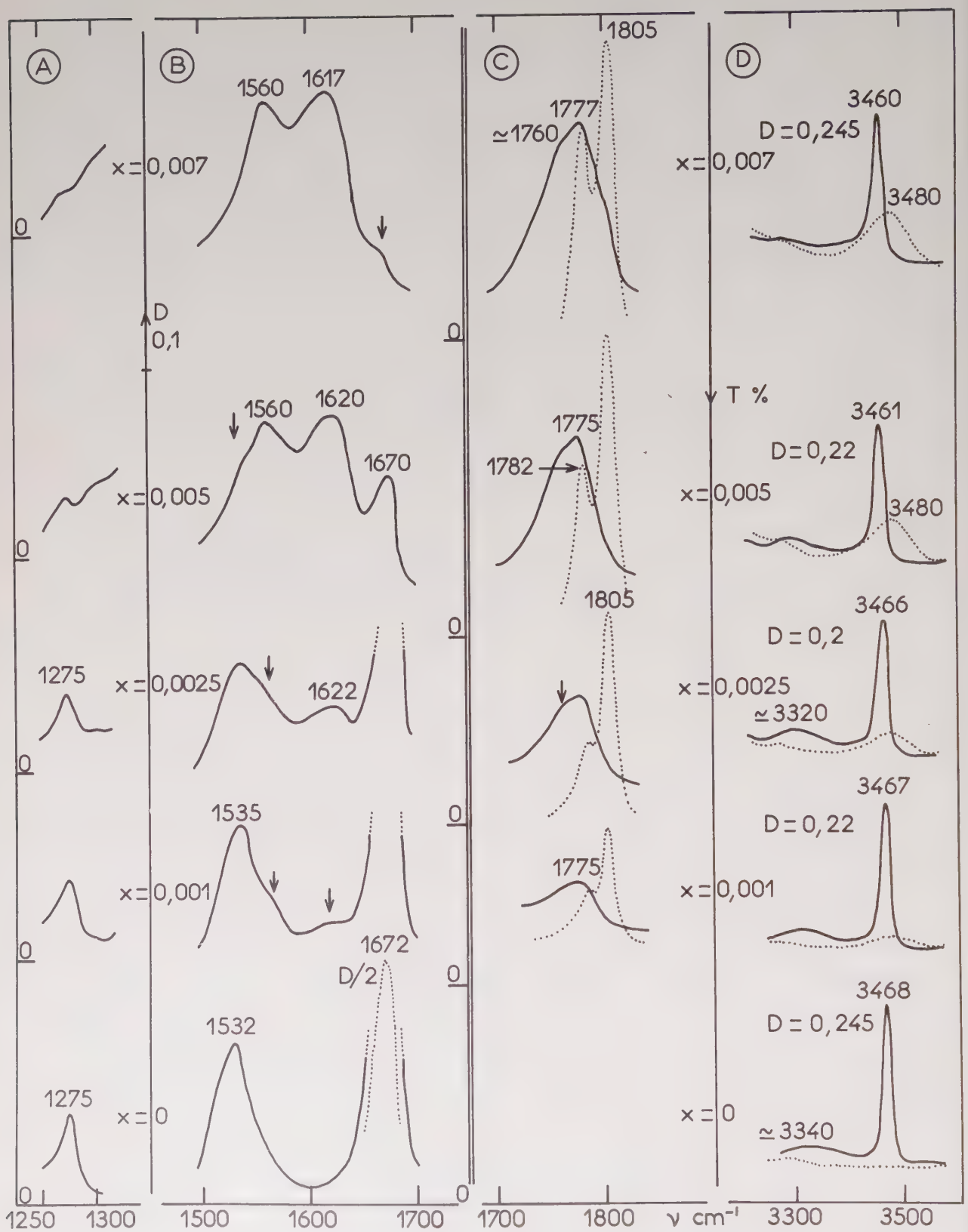


Fig. 18 Etude des mélanges NMA (0,08 M/l) - TFA - solvant (A, B, D : chloroforme, C : chlorure de méthylène) de fractions molaires (x) en acide faibles (25°C)
A : bande amide III, B : bandes amide I et II, C : bandes ν (C = O) TFA,
D : bandes amide A et ν(OH) TFA
------ : mélanges des solvants en absence de NMA

L'interprétation des spectres a été facilitée, de plus, par nos précédents résultats concernant la complexation par liaison hydrogène et la protonation des amides tertiaires (ou d'un polyacrylamide) par divers acides carboxyliques (cf. 1ère partie).

Nous donnerons tout d'abord les résultats obtenus avec l'amide modèle et ensuite ceux concernant le polymère.

2.2.1. - Etude d'un amide modèle : le N-méthylacétamide

Dans le cas des amides tertiaires, nous avons montré que l'interaction amide - acide carboxylique est caractérisée, lorsque l'acidité des mélanges croît, par la série d'équilibres :

$$B + XH \rightleftarrows B.....HX \rightleftarrows BH^+.....X^- \rightleftarrows BH^+ + X^-$$

(I) (II)

On peut penser qu'un amide secondaire, bien que moins basique qu'un amide tertiaire (99 à 101) aura un comportement analogue. Toutefois la présence de la fonction NH acide est susceptible de modifier aussi bien les phénomènes d'association (I) que ceux relatifs au transfert de proton (II) qui seront successivement présentés.

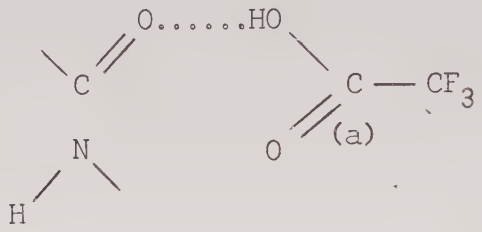
2.2.1.1. - Cas des solutions diluées en acide

La figure 18 montre l'évolution des spectres dans les régions des bandes amide III (A), amide I et II (B), ν(C=O) acide (C), ν(NH) amide et ν(OH) acide (D), de divers mélanges NMA-TFA-solvant pour lesquels la concentration d'amide est gardée constante* tandis que la teneur en acide croît, mais reste faible. Le solvant inerte est le chloroforme dans la plupart des cas ; par comparaison et pour clarifier certains spectres, on a également utilisé parfois le chlorure de méthylène. Les résultats sont qualitativement identiques dans les deux solvants.

---

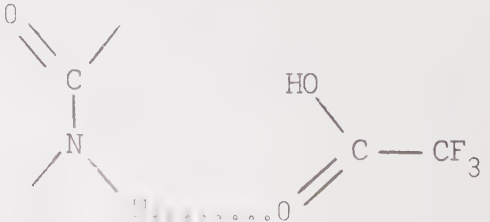
* Etant donné la faculté d'autoassociation du NMA même en solution diluée, nous nous sommes assuré qu'à la concentration choisie, les espèces sont monomères.

En mélange binaire NMA-$CHCl_3$, la bande ν(C=O) du NMA est située à 1672 cm^{-1} (fig. 18B). Par additions successives d'acide, son intensité diminue au profit d'une nouvelle bande assez large vers 1622 cm^{-1}. Cette dernière est attribuable à la vibration ν(C=O) de l'amide associé à l'acide dans des complexes par liaison hydrogène de type 1 : 1 (I) :



(I)

Ceci est confirmé par la disparition de la bande ν(OH) de l'acide monomère vers 3480 cm^{-1} (fig. 18D , comparaison des courbes en traits pleins et en pointillés). L'examen des bandes ν(C=O) de l'acide (fig. 18C) conduit à des conclusions analogues. Notons que les spectres représentés sur la figure 18C se rapportent à des solutions dans le chlorure de méthylène dans lequel l'acide est moins autoassocié que dans le chloroforme, ce qui simplifie l'interprétation. On voit que la bande ν(C=O) monomère à 1805 cm^{-1} n'apparaît plus sur les spectres des solutions contenant de l'amide, et que celle correspondant aux dimères, à 1782 cm^{-1}, change notablement d'aspect. Sur le spectre de la solution la plus diluée en TFA dans laquelle il y a peu de dimères, on relève une absorption centrée à 1775 cm^{-1} (ceci est confirmé par l'examen de solutions encore plus diluées en acide, pour lesquelles on ne décèle plus du tout de dimère). Elle doit être due à la vibration ν(C=O) (a). On sait, en effet, que la formation d'une liaison hydrogène (I) entre le groupe hydroxyle de l'acide monomère et une base entraîne, par contrecoup, un abaissement de la fréquence du vibrateur C=O carboxylique (11, 102). Sur les spectres des autres solutions, la bande située vers 1777 cm^{-1} correspond donc à une superposition des bandes ν(C=O) (a) de l'acide associé au NMA et ν(C=O) caractéristique des dimères fermés du TFA. Signalons que l'épaulement situé vers 1760 cm^{-1} ne peut être dû à une interaction de type (A) :



(A)

car le même spectre est obtenu dans le cas d'un amide tertiaire tel que le N,N-diméthylacétamide. L'existence probable dans ces mélanges, de plusieurs équilibres d'association, ne permet pas, à ce stade, une interprétation simple de cette absorption.

Sur la figure 18D est représentée, en outre, l'évolution de la bande ν(NH). On n'observe pas de modification très importante de son intensité et de sa fréquence, ce qui sembe exclure l'existence, dans ces solutions, de complexes du type (A). Ce résultat confirme les conclusions anciennes de CANNON (103). Rappelons que la bande large et faible vers 3340 cm^{-1} est due à la première harmonique de la vibration ν(C=O) amide (12) ; elle disparaît par addition progressive d'acide comme la vibration fondamentale (fig. 18B et 18D).

L'évolution des bandes amide II et III, au cours de l'interaction NMA-TFA de type (I), est représentée respectivement sur les figures 18B et 18A dans le cas de solutions chloroformiques (la transparence médiocre de ce solvant au-dessous de 1550 cm^{-1} a toutefois nécessité l'examen parallèle de solutions dans le chlorure de méthylène, en particulier pour la bande amide II). On voit que la complexation de type (I) se répercute par une élévation de fréquence de la première bande (≃ 30 cm^{-1}) et probablement aussi de la seconde, bien que sa faible intensité et l'absorption du solvant en rende l'évaluation difficile. Etant donné le résultat précédent excluant une interaction de type (A) mettant en jeu le groupe NH, on ne peut relier ces déplacements au caractère δ(NH) de ces deux vibrations, mais plutôt à la participation de ν(CN) à ces modes. En effet, la complexation du groupe carbonyle amide augmente la délocalisation électronique dans le groupe OCN et, de ce fait, renforce le caractère partiel de double liaison de la liaison CN. Rappelons que dans le cas du N,N-diméthylacétamide (DMA), la fréquence ν(CN) s'élève sensiblement par addition d'eau (48).

2.2.1.2. - Cas des solutions concentrées en acide

Les spectres des mélanges NMA-TFA-$CHCl_3$ riches en acide sont représentés sur la figure 19. Nous y avons joint dans un but comparatif ceux des mélanges correspondants DMA-TFA-$CHCl_3$. Dans les conditions expérimentales utilisées, seule la région des bandes amide I et II peut être observée. On voit que, pour une teneur en acide x = 0,01, toutes les molécules d'amide sont associées à l'acide. Si la fréquence ν(C=O) "associée" (I) de l'amide disubstitué est plus basse (1593 cm^{-1}) que celle de l'amide monosubstitué

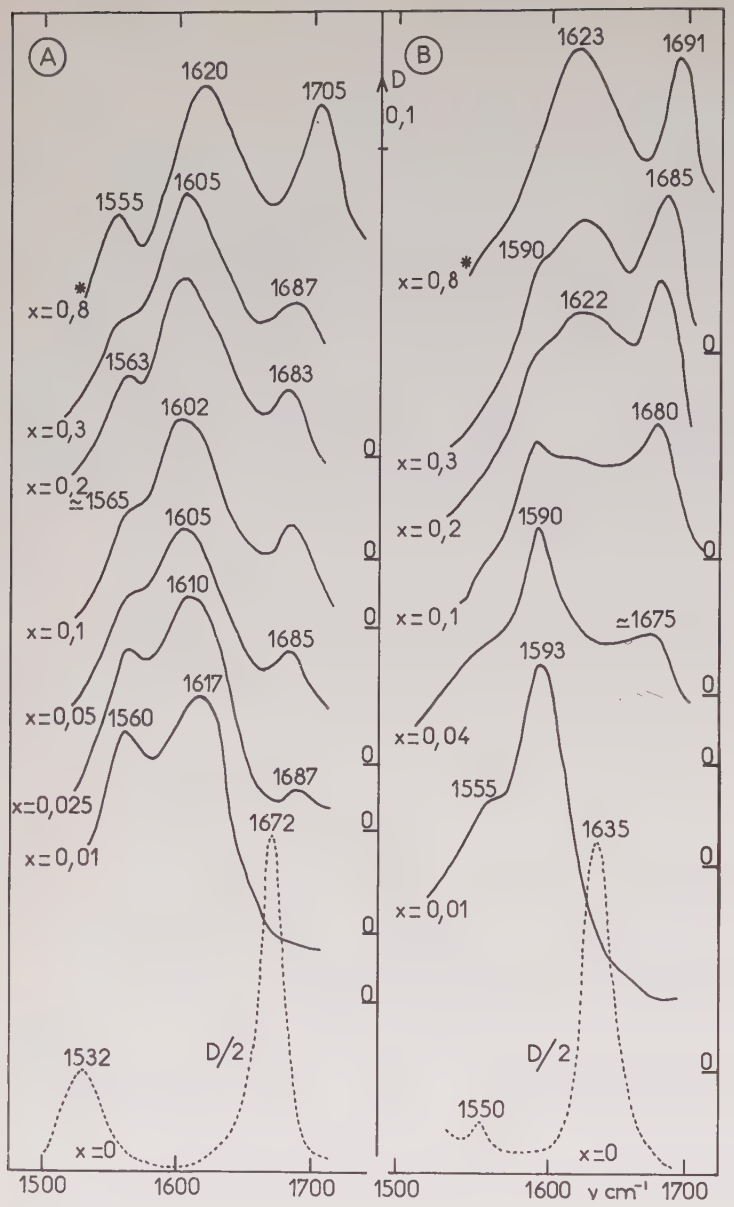


Fig. 19 Massifs d'absorption des bandes amide I et II du NMA (A) et ν(C = O) d DMA (B) à ≃ 0,08 M/l dans des mélanges TFA - $CHCl_3$ de fractions molaire (x) en acide fortes.
* Concentration d'amide ≃ 0,2 M/l

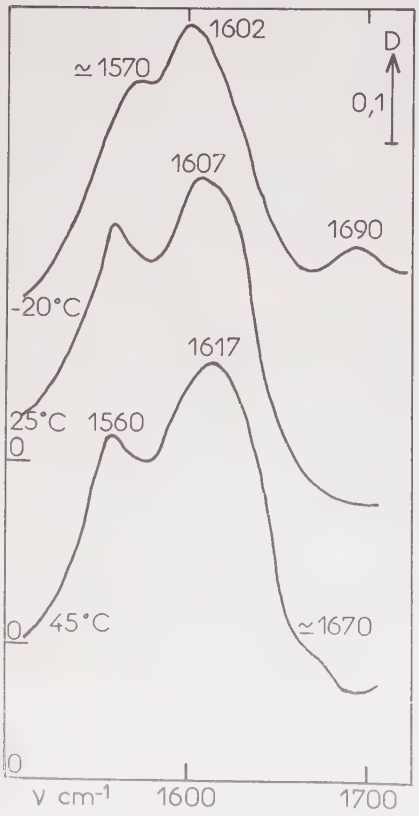
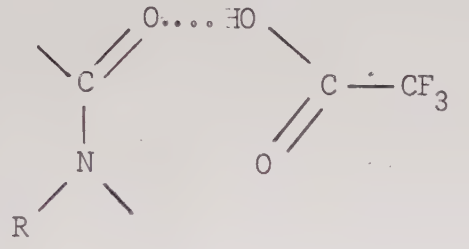


Fig. 20 Influence de la température sur une solution de NMA (0,08 M/l) dans un mélange TFA (x = 0,01) - $CHCl_3$.

(1617 cm^{-1}), les valeurs $\Delta\nu$ calculées à partir des fréquences trouvées dans le chloroforme pur sont du même ordre de grandeur (40 à 50 cm^{-1}). Au-dessus de x = 0,01, on observe d'importantes modifications des spectres qui doivent correspondre à l'apparition de nouvelles espèces.

Dans le cas du DMA (fig. 19B), on note la disparition progressive de la bande ν(C=O) "associée" et l'apparition simultanée de nouvelles bandes aux alentours de 1620 et 1680 cm^{-1} attribuables, ainsi que nous l'avons montré dans la première partie de ce travail, aux ions acétate et amidium formés lors du transfert de proton de l'acide à l'amide :

(I)  (II)

La bande à 1620 cm^{-1} est caractéristique de l'anion trifluoroacétate ($\nu_a COO^-$), celle située vers 1680 cm^{-1} est due au cation amidium. Rappelons qu'en solution aqueuse chlorhydrique ou sulfurique, cette dernière bande apparaît à la même position (48). Son attribution, encore incertaine, a été discutée précédemment (1ère partie) ; elle est probablement due à la vibration $\nu(C=\overset{+}{N})$ (la liaison CN ayant acquis un fort caractère de double liaison par suite de la protonation sur l'oxygène).

L'analyse des spectres est un peu plus complexe dans le cas du NMA (fig. 19A). Si la protonation des molécules d'amide est bien marquée par l'apparition de la bande amidium vers 1685 cm^{-1}, position analogue à celle trouvée en solution aqueuse chlorhydrique (49), la bande $\nu_a(COO^-)$ est moins bien identifiée, tout au moins dans les spectres des solutions de concentrations intermédiaires en acide. On note seulement un déplacement progressif de la bande "associée" de 1617 à 1605 cm^{-1} environ, qui peut être dû à la contribution de la bande $\nu_a(COO^-)$. Il est en effet possible que la proximité de ces deux bandes ainsi que leur largeur ne leur permettent pas de se séparer. Il est toutefois nécessaire de tenir compte de la complexité de ces solutions moyennement concentrées en acide dans lesquelles la structure des diverses espèces en présence, intermédiaires entre les complexes (I) et les ions libres

solvatés (II), est assez mal définie. Il s'agit essentiellement des paires d'ions qui ont plus ou moins tendance à se former selon le système étudié (base, conditions de concentrations, solvant inerte, etc..). Dans le cas présent, il n'est pas douteux que leur existence éventuelle rende délicate l'identification du groupe carboxylate étant donné l'interaction anion-cation qui tend à s'établir. Par ailleurs, dans des milieux en tous points identiques, en particulier par leurs propriétés diélectriques, il est vraissemblable que le NMA et le DMA ne donnent pas lieu aux mêmes phénomènes. Ceci est confirmé par le fait que, dans le cas du NMA, les solutions intermédiaires ont une forte tendance à démixer si l'on abaisse très légèrement la température, cette démixion étant sûrement à relier à l'existence de paires ioniques. Ceci ne se produit pas avec le DMA ; c'est peut-être la raison pour laquelle on distingue très vite dans les spectres de ce composé (fig. 19B) la vibration $\nu_a(COO^-)$ caractéristique des ions séparés. Cette différence de comportement disparaît toutefois dans les milieux les plus riches en acide pour lesquels les propriétés diélectriques ayant changé (alors que les concentrations relatives d'amide et d'acide ont peu varié), les paires d'ions se dissocient en ions libres solvatés comparables d'un composé à l'autre (cf. x = 0,8, fig. 19A et 19B).

Cet aspect du processus de protonation des amides par un acide carboxylique est important pour l'utilisation qui sera faite des résultats à la caractérisation des types d'interaction polypeptide - acide. On a pu montrer que les formes protonées sont plus facilement identifiées par la vibration du cation amidium peu sensible aux interactions et au milieu que par la bande $\nu_a(COO^-)$ qui est plus ou moins bien localisée selon l'état d'interaction du groupe carboxylate.

Quel que soit l'état de solvatation des espèces ioniques, on a vérifié la réversibilité thermique de ces phénomènes : ainsi, pour le NMA (fig. 20) le réchauffement d'une solution initialement à 25°C déplace l'équilibre d'association (I) dans le sens d'une diminution du nombre de complexes (apparition de ν(C=O) "libre" vers 1670 cm^{-1}) ; par contre, un refroidissement favorise la protonation (bande amidium à 1690 cm^{-1}) qui se produit bien de manière exothermique.

Signalons enfin que l'on trouve encore, sur le spectre du NMA protoné (fig. 19A), une bande vers 1560 cm^{-1}, position identique à celle de la bande amide II du NMA associé au TFA. Il ne peut plus s'agir, pour l'amide protoné, de bande amide II, étant donné la profonde modification des couplages vibrationnels initiaux qu'entraîne la protonation. Il se pourrait que cette

bande à 1560 cm^{-1} corresponde à un résidu de molécules non protonées ; cependant nous pensons qu'elle est plutôt due au cation amidium. En effet, le spectre du chlorhydrate solide (1:1) de NMA, présente également une absorption intense à 1550 cm^{-1} environ (49).

2.2.2. - Etude de la poly - L - alanine

2.2.2.1. - Mise en évidence et analyse de l'interaction polymère - acide

Sur la figure 21 sont rassemblés les spectres de la PLA (échantillons B, tableau VI) obtenus dans les régions des bandes amide I, II (fig. 21A et 21B) et A (fig. 21C), à différentes concentrations en acide (fig. 21A et 21C) et à différentes températures (fig. 21B). Le polymère, insoluble dans le chloroforme pur, présente pour une très faible concentration en acide une bande ν(C=O) à 1655 cm^{-1} caractéristique des chaînes en hélice (fig. 21A). Par additions successives d'acide, il apparaît vers 1610 cm^{-1} une nouvelle bande, plus large, dont l'intensité croît au détriment de la première. On peut raisonnablement penser qu'elle est le résultat d'une interaction spécifique polymère-acide. L'examen parallèle des bandes ν(C=O) et ν(OH) acide (non reportées sur cette figure) confirme cette interprétation : comme dans le cas du NMA (fig. 18C et 18D), leur intensité diminue. Par analogie avec cette dernière molécule, nous attribuons la bande vers 1610 cm^{-1} à des complexes par liaison hydrogène de type (I) formés entre une partie des motifs CONH et l'acide et entrant en compétition avec l'association peptidique intramoléculaire - CO...HN - . Notons que, dans le cadre d'études plus générales de polypeptides en solution dans des mélanges analogues, certains auteurs (92, 94) avaient fait correspondre cette absorption à des conformères β coexistant avec les chaînes hélicoïdales.

On peut se demander si la complexation de type I qui vient d'être caractérisée est unique ou s'il existe simultanément une interaction de type (A). L'examen des vibrations amide II (fig. 21A) et amide A (fig. 21C) ne permet pas de conclure. En effet, étant donné la concentration en amide utilisée, la bande amide A ne peut être observée que pour des solutions diluées en acide. L'épaulement qui apparaît vers 3370 cm^{-1} sur la bande à 3290 cm^{-1} (fig. 21C) caractéristique des chaînes hélicoïdales est certainement lié à l'interaction PLA-TFA ; on ne peut toutefois préciser si les groupes NH responsables de cette absorption sont libres (complexes de type (I)) ou

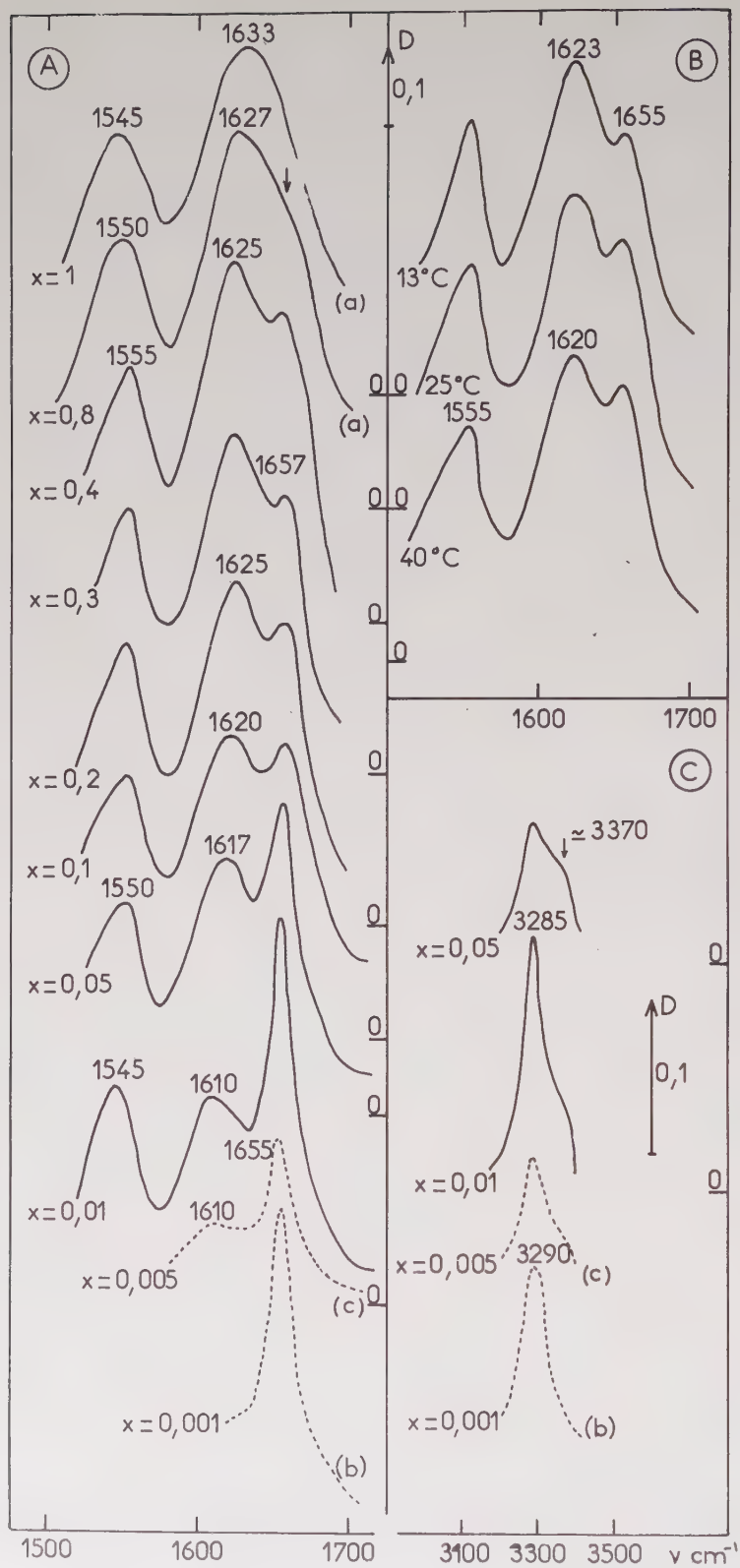


Fig. 21 Etude de la PLA (≃ 0,08 M-g/l) dans divers mélanges TFA-$CHCl_3$. A (bandes amide I et II) et C (bande amide A) : fractions molaires (x) en acide variables, B (bandes amide I et II) : température variable (PLA 0,08 M-g/l, TFA x = 0,3).

—— (a) PLA ≃ 0,3 M-g/l, ----- (b) PLA ≃ 0,007 M-g/l, ----- (c) PLA ≃ [illegible] M-g/l

associés à l'acide (complexes de type (A)). La fréquence de la vibration amide II (≃ 1550 cm^{-1}, fig. 21A) varie peu par addition d'acide, au contraire de celle du NMA (fig. 18B). Ceci s'explique si l'on se souvient que, en l'absence d'interaction avec l'acide, la liaison hydrogène intramoléculaire peptidique entraîne déjà une position élevée de cette vibration. Quand on ajoute de l'acide dans le milieu, on remplace cette association par une association avec l'acide ; en outre, on modifie vraisemblablement la délocalisation électronique du groupe OCN. La superposition de tous ces phénomènes empêche donc de conclure à l'existence ou à l'absence de complexe de type (A).

Si le type d'interaction mis en évidence pour la PLA en présence d'acide est semblable à celui qui apparaît dans le cas du NMA, la complexation du polymère se fait néanmoins beaucoup plus lentement que celle du modèle ; ceci est visible par comparaison des spectres de la PLA et du NMA pour une teneur en acide x = 0,01 par exemple (fig. 19A et 21A) et a pu être confirmé par l'examen des spectres correspondants du TFA. Ce résultat est dû, en particulier, à la différence de pouvoir accepteur de proton entre un groupe CONH isolé et un groupe CONH faisant partie d'une chaîne polypeptidique.

Dans le même ordre d'idées, on peut comparer le taux de complexation de la PLA à celui du polyacrylopipéridide (PAP), polymère atactique dont nous avons précédemment étudié la basicité (première partie). Ainsi la figure 22 montre que, dans les mêmes conditions expérimentales, le nombre de motifs amide associés à l'acide est plus important dans le cas du polyamide que dans celui du polypeptide. Pour la PLA (fig. $22A_1$), la bande amide I à 1657 cm^{-1} est beaucoup plus intense que celle des complexes de type I à 1608 cm^{-1} ; au contraire, dans le cas du PAP (fig. $22B_1$), la bande à 1635 cm^{-1} caractéristique de ν(C=O) "libre" est plus faible que la bande à 1590 cm^{-1} des complexes (I). Ceci est confirmé par l'examen parallèle des bandes ν(C=O) et ν(OH) du TFA : les perturbations sont plus importantes dans le cas du PAP que dans celui de la PLA (fig. $22A_2$ et $22B_2$, $22A_3$ et $22B_3$). Ce résultat était attendu étant donné la différence de structure entre les deux types de chaîne.

L'association du polymère avec l'acide se poursuit de façon continue avec l'enrichissement des solutions en TFA, comme le montre la figure 21A où est mise en évidence la variation d'intensité relative des bandes amide I à 1655 et 1625 cm^{-1} ; elle est toutefois toujours lente : il est nécessaire d'aller jusqu'à l'acide pur pour faire disparaître les formes hélicoïdales.

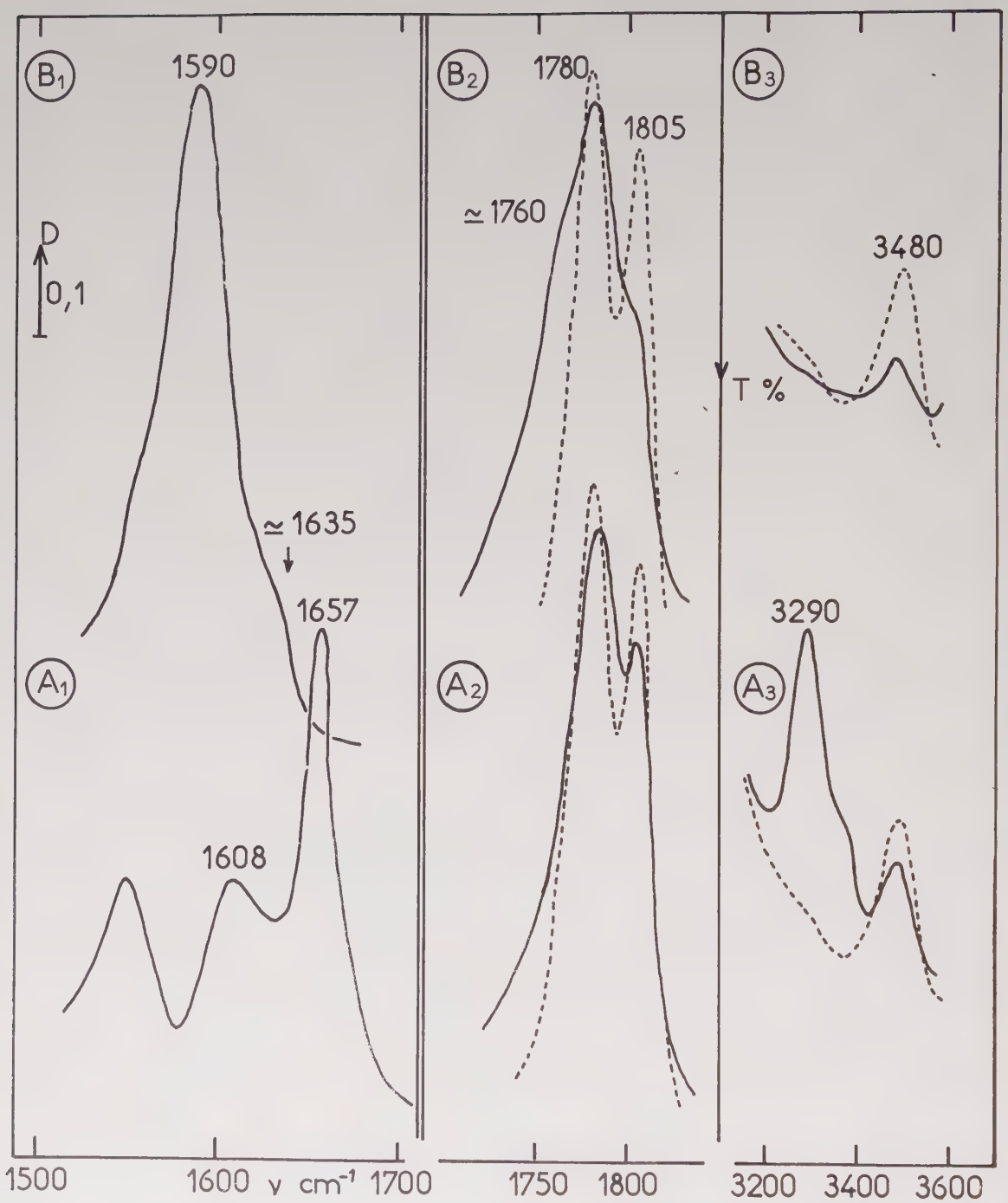


Fig. 22 Etude de la PLA (A) et du PAP (B) en solution (≈ 0,1 M-g/l) dans un mélange TFA (x = 0,01) - $CHCl_3$. Régions ν(C = O) amide (A_1, B_1), ν(C = O) acide (A_2, B_2). et νOH acide (A_3, B_3).
----- : mélange de solvants en absence de polymère

Enfin, contrairement au NMA, on n'observe pas dans les solutions les plus riches en acide (fig. 21A) de modification de spectre attribuable à la protonation. Bien que, comme nous l'avons vu, la vibration $\nu_a(COO^-)$ ne soit pas facile à localiser en raison de l'état d'interaction du groupe carboxylate dans les solutions moyennement acides, on constate que, à l'inverse de l'amide modèle (fig. 19), la bande $\nu(C=O)$ "associée" évolue d'une manière simple, ce qui ne peut s'expliquer que par l'existence d'un équilibre unique. (Notons que l'élévation de sa fréquence par addition d'acide est vraisemblablement due à un effet de milieu). De plus, et c'est l'argument qui nous paraît le plus convaincant, on ne relève pas, à fréquence élevée, une bande nouvelle caractéristique du cation amidium. D'une manière générale, d'après les études antérieures effectuées sur des amides modèles divers, soit en solution aqueuse acide (48, 49), soit en mélange solvant inerte-acide carboxylique (104, 105, fig. 19), le domaine de fréquence dans lequel est relevée cette absorption se situe vers 1660 - 1710 cm^{-1} selon le composé étudié et le milieu utilisé. Bien que nous n'ayons pas représenté sur la figure 21A la région supérieure à 1700 cm^{-1} des spectres de la PLA en milieu très acide à cause de la forte absorption de CF_3COOH qui fausse les mesures de densité optique, nous sommes sûrs que, au moins jusqu'à 1725 cm^{-1}, aucune absorption nouvelle n'apparaît.

On est conduit aux mêmes conclusions en étudiant l'influence de la température sur le spectre d'une des solutions précédentes initialement à 25°C (fig. 21B) : par réchauffement, l'équilibre d'association est déplacé dans le sens d'une stabilisation de l'hélice, alors qu'un refroidissement renforce l'interaction avec l'acide mais ne provoque pas, comme pour le NMA (fig. 20), le transfert du proton. (On note que les intensités relatives des bandes amide I caractéristiques des deux types d'association varient modérément avec la température comme avec la concentration en acide (fig. 21A), ce qui témoigne bien de la stabilité de cette hélice).

2.2.2.2. - Discussion des travaux antérieurs

Si nos conclusions confirment l'hypothèse générale de ponts d'hydrogène polypeptide - acide carboxylique proposée de diverses manières (42, 75, 85, 86, 89, 91), elles sont en désaccord avec celles des nombreux auteurs ayant caractérisé l'interaction par l'existence de formes ioniques résultant de la protonation d'un certain nombre de résidus par l'acide (71 à 78, 81 à 83). Pour certains (72 à 75, 81), la protonation n'est pas

le seul phénomène mis en jeu au cours de la destabilisation de l'hélice, cependant elle affecterait environ 10 à 60 % de résidus. D'après notre étude, il ne peut en être ainsi : l'absence de la bande caractéristique du cation amidium montre que, si l'ionisation avait lieu, elle ne pourrait concerner qu'un nombre infime de motifs, par exemple ceux situés en bouts de chaînes comme l'ont proposé WATANABE et coll. (83).

Certes, certains auteurs antérieurs avaient cru avoir mis en évidence des formes protonées par spectroscopie infrarouge. C'est le cas de VOLCHEK et coll. (75) dont les conclusions tirées de l'analyse du spectre infrarouge, dans la région amide I, de quelques polypeptides en solution dans des mélanges solvant inerte - acide carboxylique, reposent uniquement sur l'attribution de la vibration $\nu_a(COO^-)$ de l'ion carboxylate à une bande située vers 1620 cm^{-1} (la vibration $\nu(C=\overset{+}{N})$ de l'ion amidium correspondant n'a pas été décelée). Or, nous l'avons vu dans le paragraphe 2.2.1.2., cette bande est difficile à interpréter de façon simple ; en outre, les complexes par liaison hydrogène de type (I) entre le polypeptide et l'acide sont également caractérisés par une bande de fréquence proche de 1620 cm^{-1}. Elle ne constitue donc pas un critère sûr d'identification des formes ioniques amidium - acétate. Ces auteurs sont en outre conduits à envisager la protonation du polypeptide déjà à très faibles concentrations en acide et à des températures élevées (le polymère est alors hélicoïdal), et à invoquer une association par pont hydrogène aux fortes teneurs en acide et aux basses températures (le polypeptide est alors désordonné). Cette interprétation est contraire à l'ensemble de nos résultats concernant l'équilibre liaison hydrogène - protonation dans les systèmes amide (ou polyamide) - acide carboxylique qui démontrent, en particulier, que la protonation est un phénomène exothermique.

KLOTZ et coll. (71 à 74) ont, quant à eux, étudié par spectroscopie infrarouge l'harmonique $2\nu(NH)$ de divers polypeptides (dont la PLA) et expliqué le début de la transition hélice - pelote par la protonation d'une proportion importante de motifs peptides, protonation apparaissant déjà au sein des mélanges très dilués en acide. La relation entre la fréquence $2\nu(NH)$ et l'état du groupe CONH est faite, pour les polymères, par comparaison avec le NMA (90). Il semble bien délicat de tirer des conclusions de ce type d'investigation. En effet, ainsi que nous l'avons vu précédemment, l'interaction amide - acide se manifeste bien davantage par des perturbations

du squelette OCN que du groupe NH. Par ailleurs, comme l'ont fait remarquer FRANZEN et coll. (107), la fréquence 2ν(NH) peut varier par simple effet de milieu ; ceci peut entraîner des confusions pour l'identification des formes amide protoné. Enfin l'attribution de la région des vibrations harmoniques et de la 2ν(NH) en particulier n'est pas extrêmement sûre pour des systèmes aussi complexes.

Remarquons enfin que le fait d'envisager une protonation importante des chaînes de polypeptide en hélice et, de plus, à de faibles concentrations en acide, implique que le groupe CONH de ces polymères possède des propriétés basiques anormalement élevées (99, 100, 105).

2.2.2.3. - Comparaison entre les résultats spectroscopiques et l'allure de la transition hélice - pelote de la poly - L - alanine

L'analyse spectroscopique qui précède a permis de caractériser et de discuter l'interaction polypeptide - acide responsable du changement structural hélice - pelote des chaînes. Toutefois on n'a pu mettre en évidence dans les spectres une discontinuité pouvant être reliée à la coopérativité de ce type de transformation. Au contraire, on note que l'association du polymère et de l'acide est apparemment régie par une loi d'équilibre simple.

Or, d'après les résultats obtenus par les techniques globales, la PLA subit en mélanges TFA - $CHCl_3$ cette transition de conformation. Ainsi la courbe ORD de la figure 23C, d'après STEWART (42) montre, pour un échantillon (C) de masse assez élevée, qu'après une légère décroissance du paramètre b_0 entre 20 et 70 % d'acide, il y a une chute plus marquée indicatrice de la transition. L'obtention de la pelote nécessite donc une quantité très importante d'acide, ce qui témoigne de la grande stabilité de l'hélice de la PLA. Sans être aussi coopérative que celles d'autres polypeptides moins stables, cette transition indique néammoins un effondrement des chaînes en hélice dans le domaine 70 - 100 % d'acide. Or, nos résultats infrarouges semblent montrer que le passage hélice - pelote se fait progressivement dans tout le domaine des concentrations en acide. Il apparaît donc intéressant d'analyser un peu plus précisément ces résultats.

On note sur la figure 23C que la valeur maximale de b_0 (-340) est relative à un mélange contenant déjà 20 % d'acide et qu'il est donc impossible, sans extrapoler, de connaître la fraction hélicoïdale θ maximale caractéristique de ce polypeptide. En appliquant la relation empirique $\theta = - b_0/630$, on trouve un pourcentage hélicoïdal voisinant 55 %. Signalons

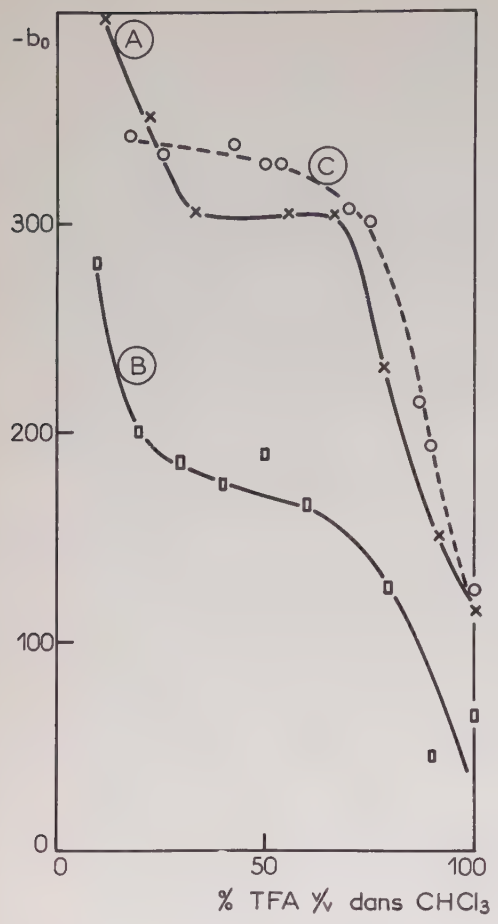


Fig. 23 Etude par ORD de divers échantillons de PLA en mélanges TFA - $CHCl_3$

	$\bar{M}_W$	C % (g/cc)	t°C	
(A)	≃ 35 000	≃ 0,2	≃ 35	
(B)	≃ 5 000	≃ 0,2	≃ 35	
(C)	≃ 50 000	0,2-2,6	-	(Ref.42)

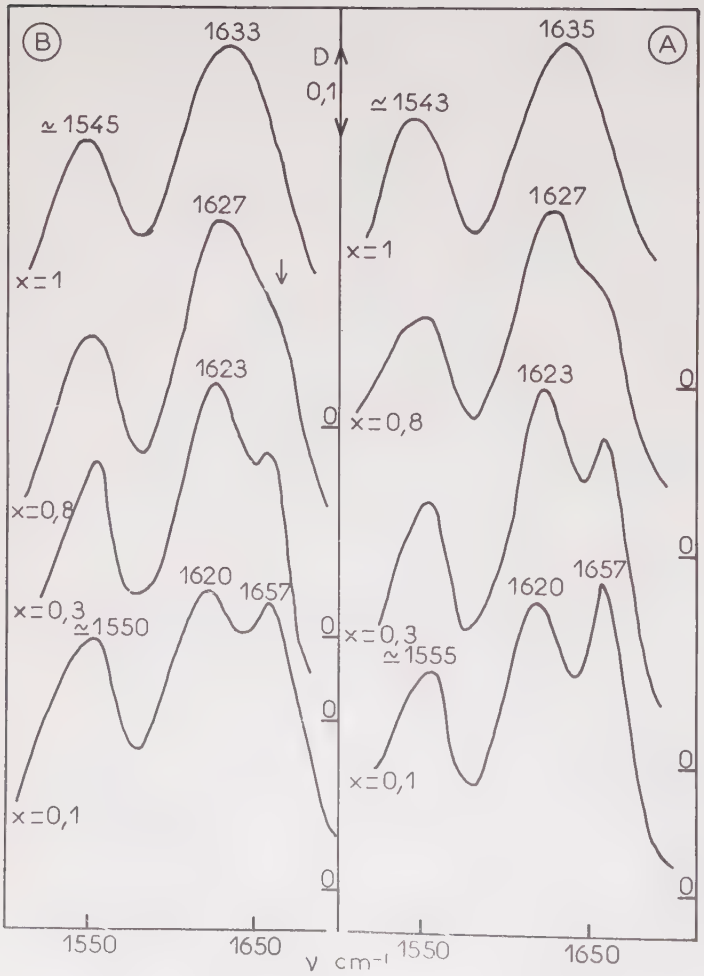


Fig. 24 Comparaison de la complexation de d
échantillons de PLA (A : $\bar{M}_W$ ≃ 35 00
B : $\bar{M}_W$ ≃ 5 000) dans quelques mélan
TFA (x) - $CHCl_3$

x = 0,1 et 0,3 : PLA ≃ 0,08 M -g/
x = 0,8 et 1 : PLA ≃ 0,3 M -g/

cependant que la signification du paramètre b_0 est assez discutée dans le cas de la PLA (108). Néammoins nous l'utiliserons comme indicateur de l'hélicité

Nous avons obtenu la courbe ORD de deux échantillons de PLA : B($\overline{M}_w \simeq 5000$) précédemment utilisé et A($\overline{M}_w \simeq 35000$) entre 10 et 100 % de TFA (fig. 23B et 23A). On note plusieurs faits : en premier lieu les valeurs de $b_{0\ max}$ sont différentes (-280 et -400) ce qui doit être relié à la meilleure hélicité de A dont les chaînes sont en moyenne les plus longues ; en second lieu on observe pour les deux polymères, entre 10 et 30 % de TFA, une première chute très marquée du b_0, qui n'apparaissait pas sur la courbe 23C débutant seulement à 20 % de TFA. Cette première diminution du b_0 semble devoir être attribuée à la transition hélice - pelote des chaînes de A et B les plus courtes qui ne peuvent se maintenir en hélice dès qu'un certain nombre de leurs résidus sont associés à l'acide (on en déduit que l'échantillon A de haut poids moléculaire doit être relativement polydispersé). Par rapport à l'étude infrarouge, on voit que ce phénomène correspond vraisemblablement à la forte complexation initiale PLA - TFA mise en évidence sur les spectres de la figure 21A.

Il est alors intéressant d'étudier, dans les mêmes conditions, le degré de complexation de ces deux échantillons. On voit sur la figure 24 que, par comparaison des rapports d'intensité des bandes amide I caractéristiques de l'hélice (1657 cm^{-1}) et du polymère en interaction avec l'acide ($\simeq$ 1620 cm^{-1}), la structure hélicoïdale est la plus stable pour le polymère A. Cette différence disparaît pour la solution dans l'acide pur dans laquelle les deux échantillons semblent totalement désordonnés (bande de la pelote à 1635 cm^{-1}).

On a donc ainsi relié le premier stade de la complexation PLA - TFA à la désorganisation initiale des chaînes de polymère les plus courtes. Ce phénomène est observé pour des échantillons de masses très différentes, ce qui indique qu'ils sont relativement polydispersés, mais il est plus important, comme on s'y attend, pour celui ayant la plus faible masse moyenne.

Si la destabilisation finale des chaînes a lieu à partir de 70-80 % de TFA sur les trois courbes de la figure 23, on note l'existence, entre 30 et 70 % d'acide, d'un palier plus ou moins net selon l'échantillon. Par spectroscopie infrarouge, il est difficile de mettre en évidence un tel palier ; cependant il n'est pas impossible qu'il existe (fig. 21A). Dans ce cas, il y aurait une corrélation entre le taux de complexation observé par infrarouge et le taux d'hélicité donné par ORD. Dans le cas contraire, on peut se demander quel est l'état conformationnel des résidus qui interagissent avec l'acide. Les auteurs qui sont favorables à la formation de liaisons hydrogène polymère - acide ne sont pas toujours complètement en accord sur

ce point. Pour certains, le groupe carboxylique s'associe déjà au polypeptide dans sa forme hélice (soit sur un motif amide simple (42), soit sur une paire de motifs (85)); pour d'autres (86, 89), l'acide n'interagit pas fortement avec les formes hélicoïdales mais surtout avec les parties en pelote. Une évaluation assez grossière du taux de complexation des motifs amide dans les mélanges voisinant 40 % d'acide montre que plus de la moitié des groupes carbonyle sont en interaction avec l'acide. Si la plupart d'entre eux doivent appartenir à des chaînes déjà désorganisées ou à des extrémités de séquences encore hélicoïdales, il est possible qu'un certain nombre soient situés à l'intérieur de chaînes hélicoïdales, celles-ci conservant néammoins leur structure ordonnée. Ceci est plausible car la liaison hydrogène peptidique intramoléculaire n'est pas la seule force stabilisatrice de l'hélice et les interactions non liées du type dipolaire jouent un rôle important. Il est tentant, par ailleurs, d'imaginer une hélice déformée par rapport à celle de départ, dans laquelle une liaison hydrogène double s'établit sur le groupe carbonyle à la fois par le motif amide le plus proche et par l'acide, une telle complexation entraînant une variation des paramètres géométriques de l'enroulement hélicoïdal. Cette possibilité sera envisagée, comme nous le verrons dans la suite, pour la PLA en solution dans l'hexafluoroisopropanol ; de plus elle n'est pas incompatible avec le pouvoir accepteur de proton du groupe carbonyle (5).

L'étude d'échantillons de PLA de hauts poids moléculaires et très peu polydispersés devrait certainement permettre de préciser ces problèmes.

* *

*

L'étude précédente a permis de mettre en évidence le mécanisme qui, au niveau des interactions spécifiques, est responsable de la destabilisation des hélices de polymère. On a pu caractériser, en effet, l'existence de liaisons hydrogène polypeptide - acide et exclure la formation d'espèces protonées. Il est certain que cette interaction est la principale responsable de la transition hélice - pelote. Le cas de la poly - L - alanine est toutefois assez complexe. D'une part, on a pu noter l'influence de la polydispersité des échantillons sur les résultats ; à cet égard, si l'on a pu dégager une corrélation entre le taux de complexation infrarouge et le taux d'hélicité ORD,

cette corrélation est toutefois assez qualitative et nécessite d'être approfondie. Par ailleurs, en raison de la forte stabilité des hélices des chaînes les plus longues, les spectres infrarouges n'ont pas permis d'étudier l'aspect coopératif de la transition.

Nous allons maintenant examiner divers autres polymères présentant des transitions plus nettes et plus caractéristiques dans ces mélanges de solvants. Ce sont des polymères à chaînes latérales encombrées, possédant des fonctions relativement polaires (ester, thioéther) et dont la transition en présence d'acide carboxylique halogéné est beaucoup plus facile à obtenir que celle de la PLA.

L'origine de ces différences de stabilité réside dans la nature et la force des interactions intramoléculaires non liées entre chaînes latérales elles-mêmes ou entre chaînes latérales et principale qui induisent à la fois le sens de l'hélice et sa cohésion.

On peut espérer que l'étude de quelques-uns de ces polypeptides en mélanges acides permettra de préciser les problèmes évoqués et éventuellement d'apporter quelques éclaircissements sur le comportement des chaînes latérales polaires au cours de la transition.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA TRANSFORMATION HELICE - CHAINE STATISTIQUE DE QUELQUES POLYPEPTIDES A CHAINES LATERALES POLAIRES

2.3.1. - Présentation des polymères étudiés

Les polymères que nous avons choisis pour cette étude ont leurs caractéristiques rassemblées sur le tableau VI. Ils y sont présentés de gauche à droite par ordre de stabilité hélicoïdale décroissante soit :

(alanine) > méthionine > γ - glutamate > β - aspartate

Ce classement est tiré des résultats ORD sur la transition hélice - pelote de ces polypeptides et se rapporte au taux d'acide nécessaire pour obtenir la transformation de structure.

On peut voir que plusieurs types de mélanges sont utilisés par les auteurs. En fonction de la force de l'acide carboxylique (acide trifluoro - TFA ou dichloroacétique DCA) l'activité "dénaturante" de ces mélanges peut être classée dans l'ordre :

TFA - DCA > TFA - solvant inerte > DCA - solvant inerte

Le solvant inerte utilisé (chloroforme, dichloroéthylène etc...) n'est pas sans effet sur l'obtention de la transition, à cause de sa polarité propre, mais cette influence est secondaire par rapport au rôle de l'acide.

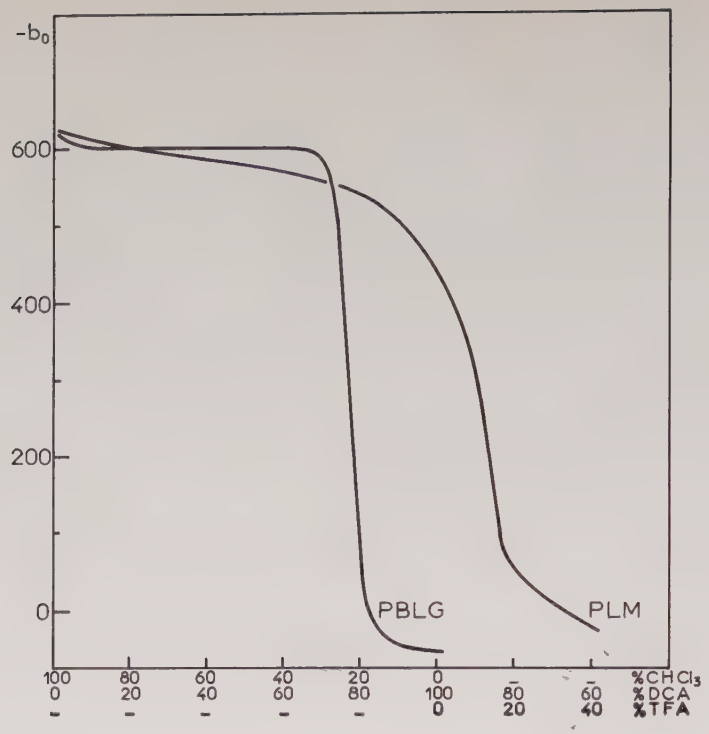


Fig. 25 Courbes ORD du PBLG (d'après FRASER)(109) et de la PLM (d'après BLOOM) (110) en mélanges acide carboxylique - solvant organique.

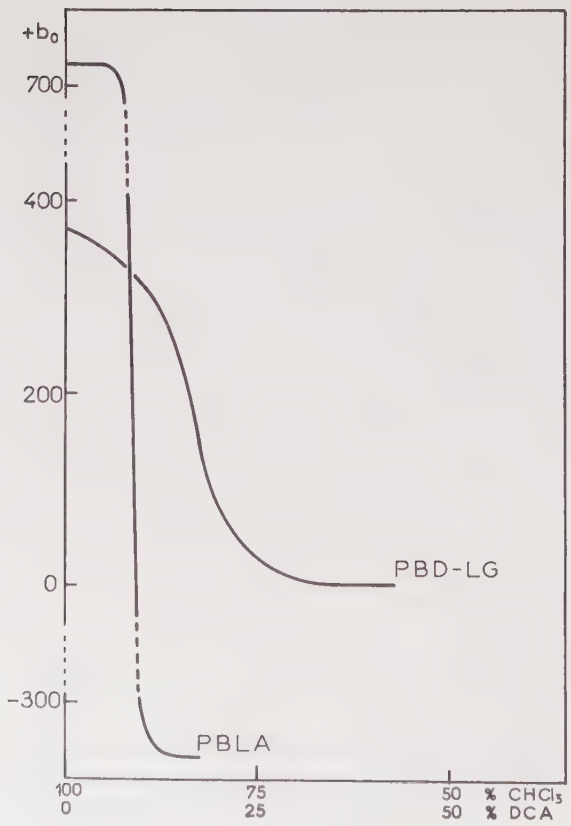


Fig. 26 Courbes ORD du PBD-LG (d'après HEITZ)(111) et du PBLA (d'après BRADBURY)(112) en mélanges acide carboxylique - solvant organique.

Pour des raisons de commodité expérimentale, nous n'étudierons que les mélanges TFA - $CHCl_3$. L'interprétation des spectres nécessitera de s'appuyer qualitativement sur les résultats d'une technique globale (ORD) donnant l'allure des courbes de transition hélice - pelote de chacun des polymères. Comme il n'est pas possible de trouver dans la littérature de résultats relatifs au même mélange TFA - $CHCl_3$, nous avons rassemblé les courbes obtenues à partir de divers couples de solvants (fig. 25 et 26). La comparaison qualitative avec nos résultats pourra être faite étant donné qu'une différence de milieu acide ne se répercute que par un déplacement de la transition sans en changer fondamentalement l'aspect. En outre les autres conditions expérimentales utilisées par les différents auteurs ne sont pas identiques, en particulier la concentration des solutions en polymère, le degré de polymérisation des chaînes, la température etc... Ces paramètres influent quantitativement à des degrés divers sur la courbe de transition dont l'allure générale reste cependant la même.

En ce qui concerne le PBLG et la PLM (fig. 25), la valeur négative du paramètre b_0 indique que les hélices de ces polypeptides sont droites. Contrairement à la PLA, les valeurs extrêmes de ce paramètre (-600 ; 0) ainsi que sa variation brutale à la transition, montrent que ces polymères constituent de bons cas d'étude de la transition coopérative.

Dans le cas des PBD-LG et PBLA (fig. 26) on note par contre que le signe de b_0 est positif. Le PBLA est bien connu pour donner une hélice gauche (112), cette préférence étant liée aux interactions défavorables entre chaînes latérales et principale qui tendent à s'établir dans un enroulement droit. Ces interactions ne sont toutefois pas complètement éliminées dans la forme gauche et induisent la faible stabilité hélicoïdale de ce polypeptide. L'existence de la structure hélicoïdale dans les copolymères D,L a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Le cas du copolymère méso alterné est assez particulier ; en effet, il est, en raison de la conjugaison d'un grand nombre d'interactions défavorables (entre chaînes latérales et principale mais aussi entre chaînes latérales elles-mêmes), le moins apte à adopter une conformation ordonnée. Toutefois on a pu montrer, dans certains cas, l'existence d'une telle structure, en particulier pour le PBD-LG. HEITZ et coll. (98) ont ainsi étudié un échantillon de ce polymère de masse assez faible et décelé, en milieu chloroformique, une hélice α gauche au moins partielle comme l'indique la valeur maximale du b_0. Sa stabilité vis à vis de l'acide, tout en étant

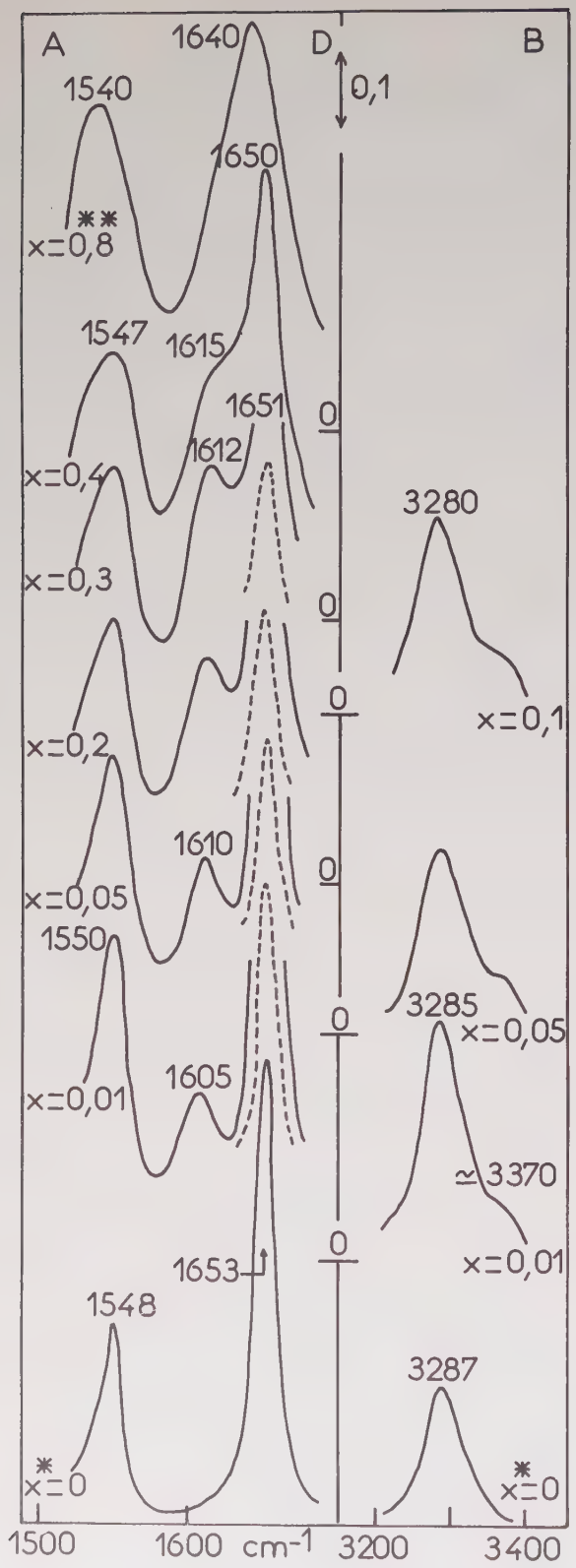


Fig. 27 Massifs d'absorption des bandes amide I et II (A) et amide A (B) de la PLM (≃0,08 M-g/l) dans des mélanges TFA - $CHCl_3$ (25°C) (x : fractions molaires d'acide).
----- : courbes en D/2
* 0,04 M-g/l ** : 0,3 M-g/l

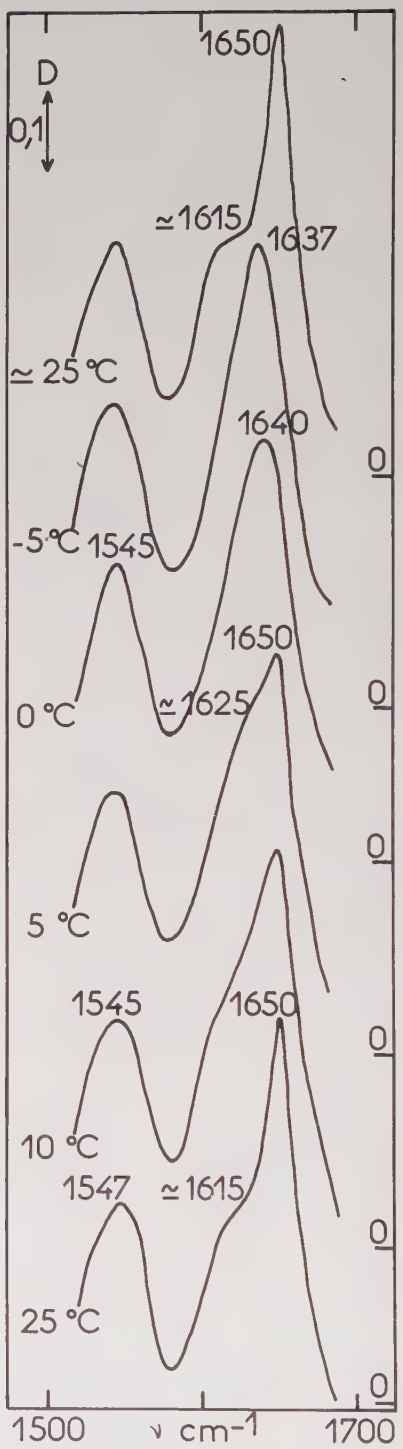


Fig. 28 Influence de la température sur le spectre de la PLM (≃ 0,08 M-g/l) dans un mélange TFA (x = 0,4) - $CHCl_3$.

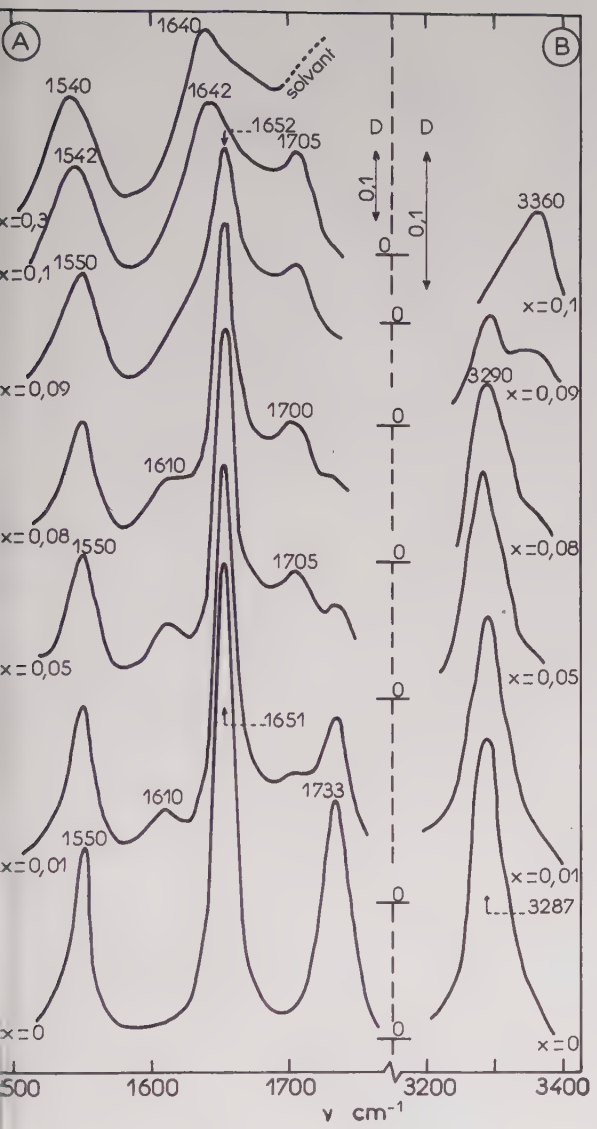


Fig. 29 Massifs d'absorption ν(C = O) (A) et ν(NH) (B) du PBLG (≃ 0,04 M-g/l) dans des mélanges TFA - $CHCl_3$ (25°) (x : fractions molaires d'acide).

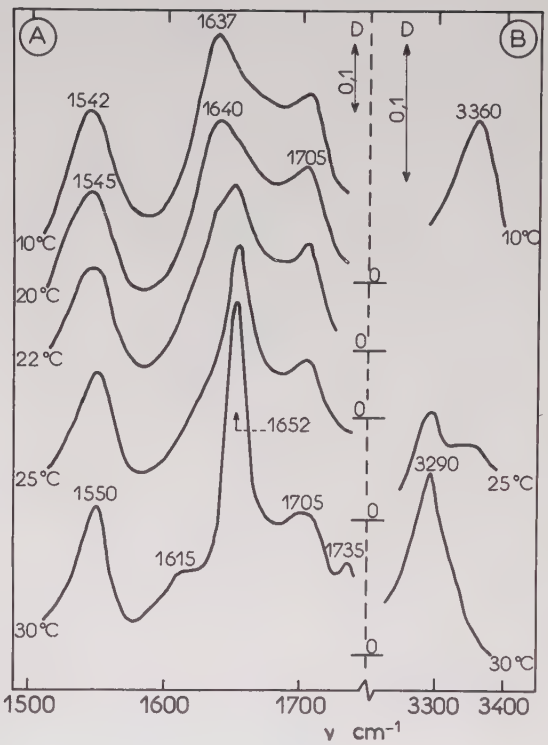


Fig. 30 Influence de la température sur les spectres du PBLG (≃ 0,04 M-g/l) en solution dans un mélange TFA (x=0,09) - $CHCl_3$ (A) : région ν(C = O) (B) : région ν(NH)

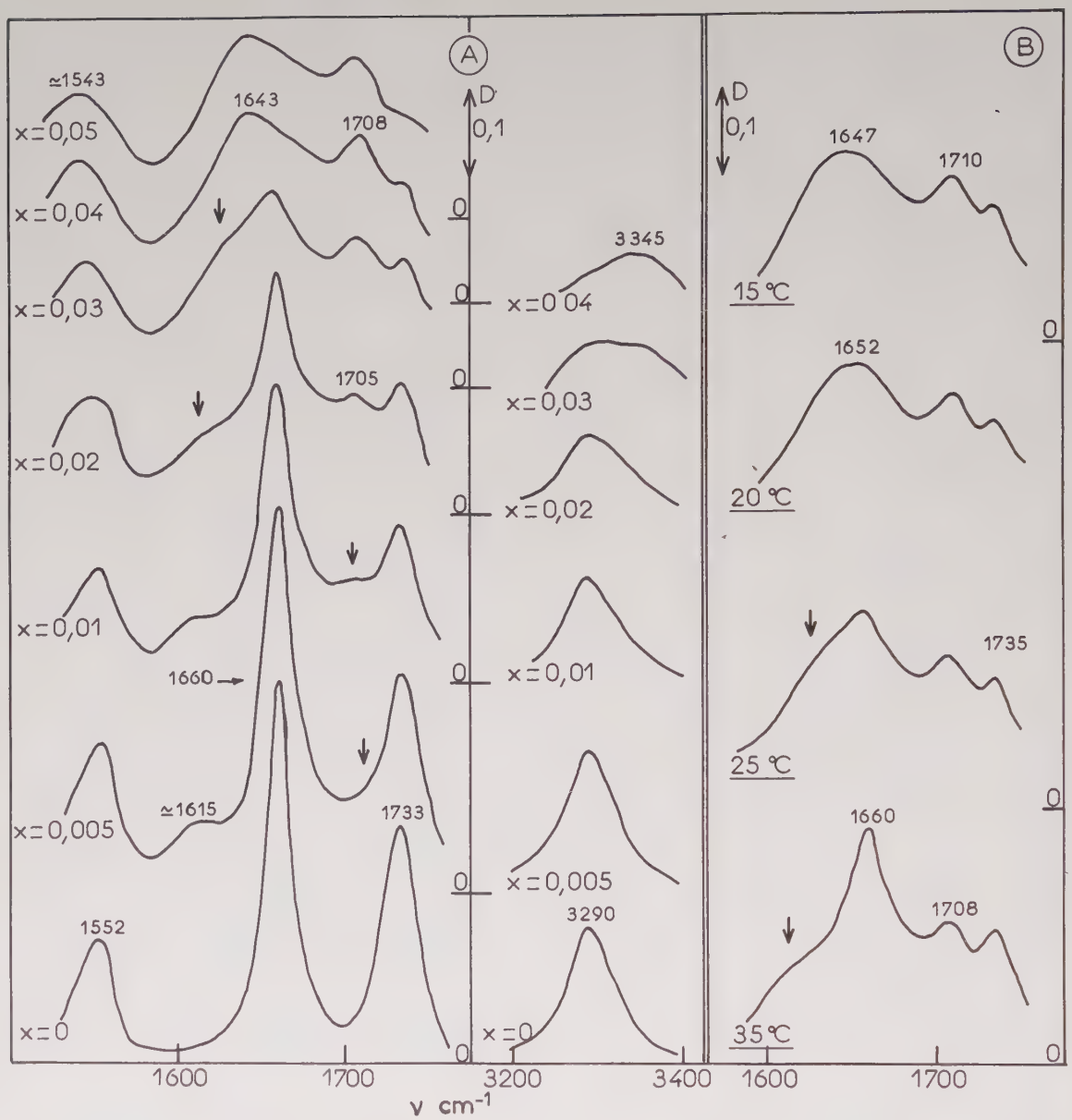


Fig. 31 Etude du PBD-LG (≃ 0,03 M-g/l) dans des mélanges TFA - $CHCl_3$. A(régions ν(C = O) et ν(NH)): fraction molaire (x) d'acide variable (25°C), B(région ν(C = O)) : température variable (PBD-LG 0,03 M-g/l, TFA x = 0,03).

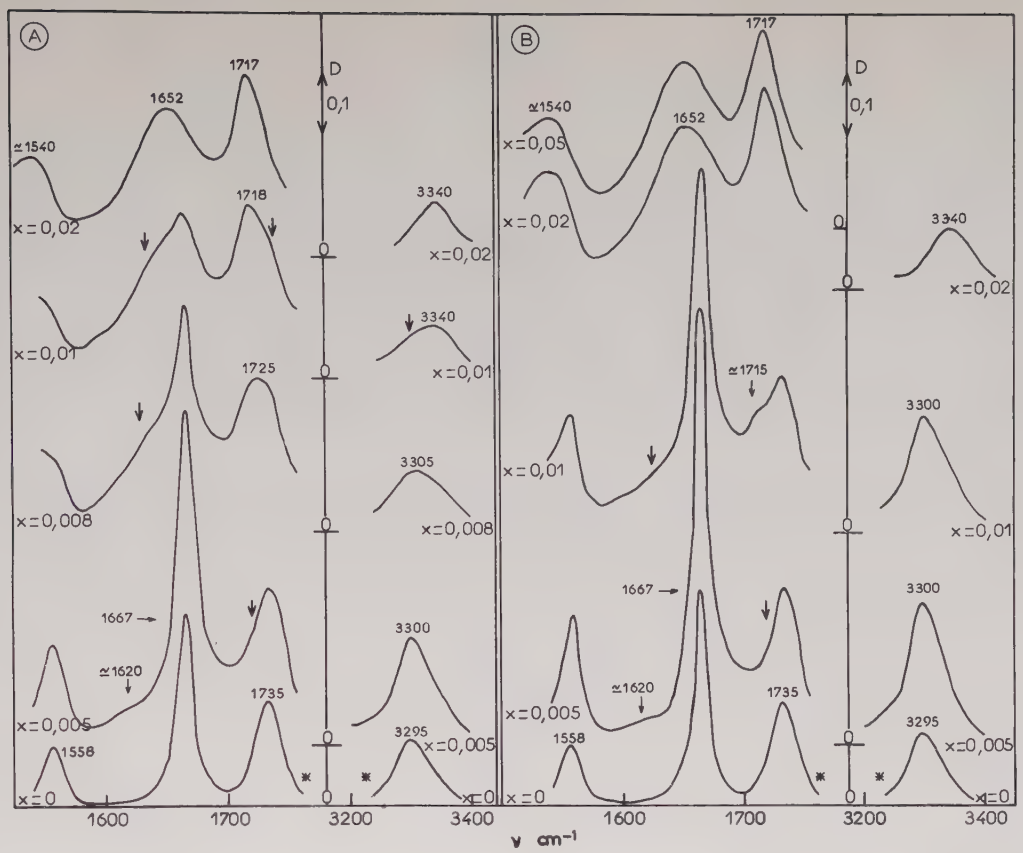


Fig. 32 Etude du PBLA (≃ 0,04 M-g/l) (A : $\overline{M}_W$ faible, B : $\overline{M}_W$ ≃ 150 000) dans des mélanges TFA - $CHCl_3$ (25°C) de fraction molaire (x) d'acide variable. Régions ν(C = O) et ν(NH)

* PBLA ≃ 0,02 M-g/l

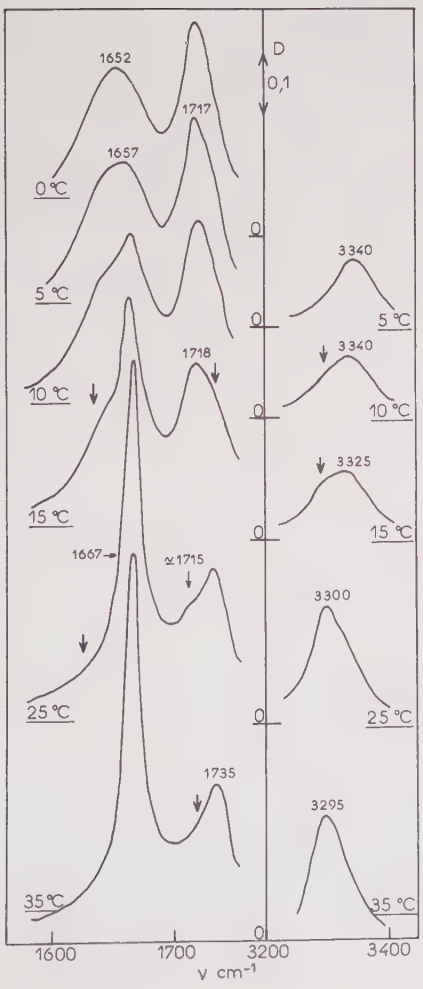


Fig. 33 Influence de la température sur les spectres du PBLA (B) (≃ 0,04 M-g/l) en solution dans un mélange TFA (x = 0,01) - $CHCl_3$. Régions ν(C = O) et ν(NH)

assez faible, est néanmoins supérieure à celle de l'hélice du PBLA ainsi que le montre la figure 26.

2.3.2. - Mise en évidence des caractéristiques spectroscopiques de la transition coopérative par l'analyse des bandes amide

Les figures 27 à 33 rassemblent les spectres dans les régions 1800-1500 et 3400-3200 cm^{-1} de mélanges polymère - TFA - $CHCl_3$ obtenus en faisant varier soit la proportion d'acide x, soit la température. Le comportement des bandes ν(C=O) et ν(OH) acide n'y est pas reporté afin de ne pas les encombrer ; leur examen simultané a toutefois conduit aux mêmes observations que celles qui ont été faites précédemment.

2.3.2.1. - Cas des solutions dans le chloroforme pur : structures hélicoïdales

En l'absence d'acide, les fréquences des bandes amide I, II et A des polypeptides sont en relation avec le sens d'enroulement de leur hélice (tableau V). Ainsi les hélices α droites de la PLM et du PBLG (fig. 27 et 29) sont caractérisées par des fréquences très voisines (≃ 1652, 1550 et 3287 cm^{-1}) et plus basses que celles de l'hélice α gauche du PBLA (1667, 1558 et 3295 cm^{-1}) (fig. 32). L'élévation des fréquences des bandes amide I et A lorsqu'on passe de l'hélice droite à l'hélice gauche peut, en première approximation, être attribuée à un affaiblissement de la liaison hydrogène peptidique*. En ce qui concerne le PBD-LG (fig. 31), ses fréquences (1660, 1552, 3290 cm^{-1}) sont intermédiaires entre celles des hélices droite et gauche précédentes ; il semblerait ainsi que la liaison hydrogène de ce polymère soit plus forte que celle existant pour l'hélice du PBLA.

On note par ailleurs l'étroitesse de la bande amide I de ces hélices, en relation avec le degré d'ordre des chaînes. A cet égard la comparaison de deux échantillons de PBLA de masses différentes en solution dans $CHCl_3$ est intéressante (fig. 32) : les coefficients d'extinction moléculaire (ε) au maximum des bandes amide ne sont pas identiques d'un échantillon à l'autre. En particulier on voit sur la bande amide I (1667 cm^{-1}) que le polymère B de masse élevée a une densité optique maximum plus forte que

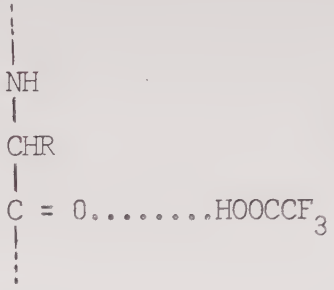
---

* On devrait constater alors un abaissement de la fréquence amide II ; l'élévation observée est cependant générale (cf. tableau V) et ne peut être expliquée simplement en raison de la complexité des divers mouvements inclus dans ce mode.

celle du polymère A de faible masse. Les conditions expérimentales étant identiques, ceci est à relier à la meilleure hélicité du polymère B dont les chaînes sont, en moyenne, les plus longues. Toutefois si l'on comparait non plus les ε des bandes mais leurs surfaces, il est probable qu'une telle différence n'apparaîtrait plus.

2.3.2.2. - Cas des solutions acides : transition hélice - pelote

Examinons maintenant l'évolution des bandes amide lorsqu'on ajoute progressivement de l'acide aux solutions. On voit dans tous les cas, dès la première addition de TFA, apparaître une bande large et faible vers 1610 - 1620 cm^{-1} * tandis que l'intensité de la bande amide I diminue. Ce comportement est qualitativement le même que celui décrit dans le cas de la poly - L - alanine et peut donc être attribué à la formation de complexes par liaison hydrogène de type (I) entre l'acide et un certain nombre de motifs peptidiques des chaînes :



(I)

A la différence de la PLA, il apparaît toutefois que la croissance de cette association avec la quantité d'acide est assez limitée. Ceci est en particulier visible dans le cas de la PLM (fig. 27) et du PBLG (fig. 29) pour lesquels l'évolution en sens contraire des bandes amide I de l'hélice et des complexes (I) n'est pas aussi accentuée que dans le cas de la PLA (fig. 21). Par exemple on voit que pour x = 0,4, le nombre de complexes (I) est beaucoup plus important pour la PLA (fig. 21) que pour la PLM (fig. 27).

Au dessus d'une certaine fraction molaire en acide : 0,4 pour la PLM, 0,09 pour le PBLG, 0,03 pour le PBD-LG et 0,01 pour le PBLA, le système des deux bandes amide I est soudainement remplacé par une bande simple, large, vers 1640 - 1650 cm^{-1}. Il y a ainsi une discontinuité dans

---

* Signalons, ainsi que nous l'avons montré dans le chapitre II, que cette bande ne peut pas être reliée à la protonation des chaînes de polymère comme l'ont proposé VOLCHEK et coll. (75).

l'allure des spectres et donc dans la complexation polypeptide - TFA, au contraire de ce qui avait été constaté dans le cas de la PLA. Cette discontinuité qui apparaît dans un étroit domaine de concentration en acide est à relier à l'effondrement coopératif des chaînes en hélice. La nouvelle bande (1640 - 1650 cm^{-1}) est alors attribuable aux carbonyles amide de la pelote statistique solvatée par l'acide. Il est difficile de dire si tous les groupes amide sont en interaction avec l'acide (complexes I) ; on peut cependant penser que la rupture instantanée de toutes les liaisons hydrogène intramoléculaires favorise cette association qui devient alors maximale au moment de la transition. (L'absence de variation de spectre lorsqu'on passe aux solutions les plus concentrées en acide est en faveur de cette interprétation).

On remarque que la bande amide I de la pelote est large et de fréquence inférieure à celle de l'hélice. Ces faits sont à relier respectivement au désordre des chaînes solvatées et au fait que la liaison hydrogène intermoléculaire polymère - acide est plus forte que la liaison hydrogène intramoléculaire peptidique. A cet égard, il est à noter que la fréquence des complexes (I) croît au cours de l'étude (de 1610 - 1620 cm^{-1} à 1640 - 1650 cm^{-1}). Ceci avait également été remarqué dans le cas de la PLA (fig. 21). Si l'on doit vraisemblablement tenir compte de la variation des propriétés diélectriques du milieu pour expliquer ce phénomène, il faut probablement aussi souligner que ces complexes polypeptide - acide se trouvent dans des situations et donc dans des états d'interaction différents selon la conformation globale des chaînes.

La transition hélice-pelote ne se manisfeste pas seulement par des modifications de la bande amide I. En effet les bandes amide A et II reflètent également la rupture brusque du système de liaisons hydrogène peptidiques : la bande amide A subit à la transition une élévation de 45 à 70 cm^{-1} selon le polypeptide et la bande amide II s'abaisse d'environ 10 cm^{-1} (fig. 27, 29, 31 et 32). Ces déplacements de fréquence confirment bien l'interprétation précédente. On peut remarquer que la fréquence ν(NH) de la pelote est relativement basse (3360 à 3340 cm^{-1}) par rapport à celle d'un amide isolé (fig. 18) ; il est toutefois difficile de préciser si les groupes NH sont ou non associés aux groupes C = O acide dans des complexes (A).

* *

*

L'étude qui précède a montré qu'il est possible de mettre en évidence, par spectroscopie infrarouge, la transformation coopérative hélice - pelote dans un étroit domaine de concentration en acide telle qu'elle est décelée par ORD et expliquée théoriquement. De plus, l'interprétation des spectres de la région des vibrations amide a permis d'analyser la solvatation de la chaîne principale au cours de sa transformation de structure.

Il est aussi intéressant d'examiner le comportement de ces mélanges à teneur en acide fixe mais à température variable. Les spectres des polymères précédents sont reportés sur les figures 28, 30, 31 et 33. Dans chaque cas, le mélange choisi a une concentration en acide très proche de celle caractéristique de la transition. A partir de solutions à 25°C pour lesquelles la conformation hélicoïdale est prédominante, un réchauffement vers 30-35°C renforce le caractère hélicoïdal en défavorisant la formation de complexes (I) (évolution en sens inverse des bandes amide I) tandis qu'un refroidissement plus ou moins important selon le polypeptide, provoque la fusion coopérative des chaînes en renforçant l'interaction polymère - TFA. Ainsi est mis en relief l'aspect exothermique de ce type de transition "inversé" expliqué par les travaux théoriques et montré expérimentalement en particulier par les techniques globales. Signalons en outre que le domaine de température au cours duquel s'effectue la transition est étroit en particulier pour le PBLG (fig. 30).

2.3.3. - Tentative de mesure du taux de complexation polymère - acide avant la transition

On a pu constater lors de l'étude de la transition de la PLM, du PBLG et du PBLA de forte masse que la formation de complexes (I) avec l'acide est, avant la transformation en pelote des chaînes, relativement peu accentuée. En effet, lorsque les solutions s'enrichissent en acide, les intensités des bandes amide I caractéristiques de l'hélice et des complexes (I) ne sont pas très sensiblement modifiées. Ceci est assez net pour le PBLG et la PLM (fig. 29 et 27). Il est intéressant de chercher à préciser ce phénomène d'un point de vue plus quantitatif.

Une technique consiste à doser dans les mélanges ternaires, la fraction de sites carbonyle amide engagés dans des complexes avec l'acide. C'est une méthode classique en spectroscopie infrarouge que nous avons appliquée dans la première partie de ce travail dans des conditions très favorables (solutions diluées, un seul équilibre de complexation, non recouvrement des bandes etc...). Le problème est ici beaucoup plus complexe en raison

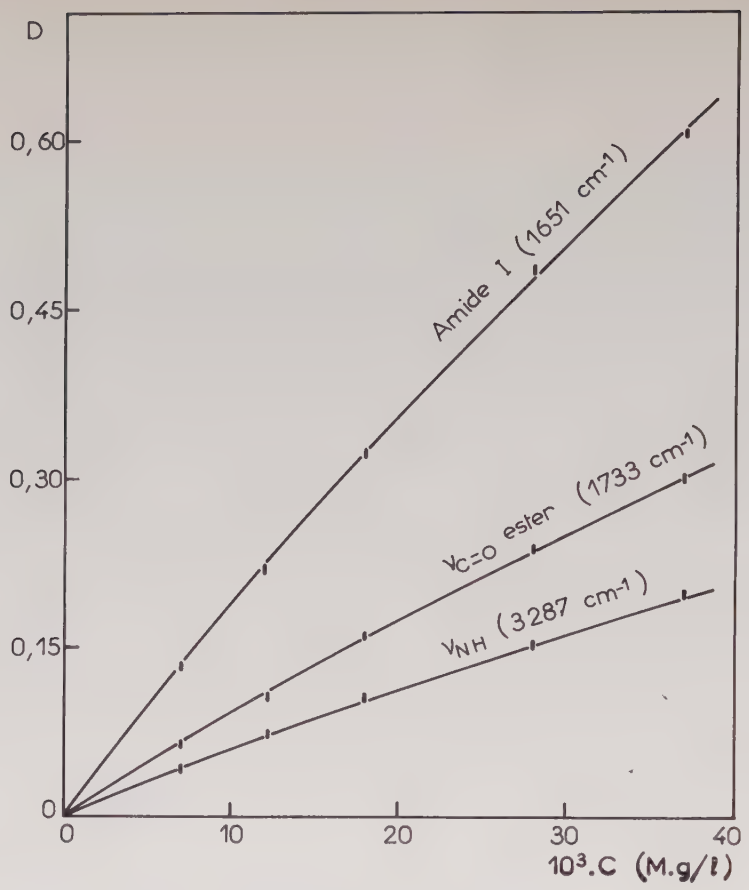


Fig. 34 Mesure des densités optiques au maximum des bandes amide I, ν(C = O) ester et ν(NH) du PBLG à diverses concentrations dans le chloroforme à 25°C.

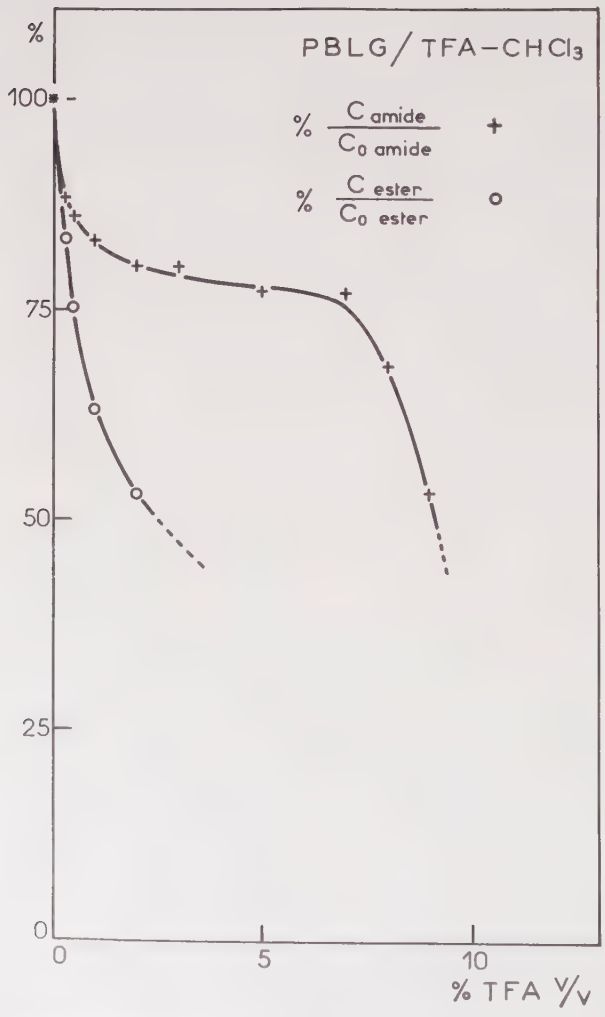


Fig. 35 [illegible] complexation amide et ester du PBLG en mé-
[illegible]

d'une part, de la coexistence de plusieurs équilibres d'association (acide - acide, acide-polymère) et d'autre part, de l'important recouvrement des bandes $\nu(C=O)$ de la région 1800 - 1600 cm^{-1} (la région de la bande $\nu(OH)$ monomère ne peut être utilisée dans ce cas à cause de la forte autoassociation de l'acide).

En dépit de ces difficultés, il est possible dans le cas du PBLG, de mesurer les densités optiques maximum des bandes $\nu(C=O)$ dans un domaine convenable de concentration en acide.

On étudie tout d'abord des mélanges binaires PBLG - $CHCl_3$ afin d'obtenir la courbe d'étalonnage de la bande amide I du PBLG et de vérifier son obéissance à la loi de Beer - Lambert. On voit sur la figure 34, sur laquelle sont aussi reportées les variations obtenues pour les bandes $\nu(C=O)$ ester et $\nu(NH)$, que l'on obtient une relation linéaire entre la densité optique et la concentration. L'utilisation de ces droites pour traiter les résultats des spectres des mélanges ternaires acides nécessite de faire l'hypothèse que les coefficients d'extinction moléculaire des bandes restent inchangés. C'est une approximation correcte par rapport aux autres sources d'erreur.

Soit C_o la concentration initiale de polypeptide introduit dans le mélange et C la quantité, à l'équilibre, de polymère non associé à l'acide, déterminée à partir du graphique précédent et de la mesure de la densité optique de la bande amide I. La différence $C_o - C$ donne la concentration en sites carbonyle amide complexés. Une façon de suivre la complexation consiste à porter le rapport C/C_o en fonction de l'acidité. La figure 35 montre les résultats obtenus* pour les mélanges $0 \leq x \leq 0,09$. On constate que dès les toutes premières additions d'acide, celui-ci interagit avec les fonctions amide ; toutefois cette interaction ne croît pas de manière continue et dès la valeur $x = 0,02$, elle se stabilise aux environs de 20 à 25 % des motifs peptidiques. Jusqu'à $x = 0,07$ on ne constate aucune évolution sensible, puis au-dessus de cette concentration en acide, on observe un effondrement brutal qui correspond à la fusion des chaînes. Il apparaît donc que l'association chaîne principale - acide avant la transition n'obéit pas à une loi d'équilibre simple. On peut supposer que l'acide se fixe sur les fonctions amide les plus basiques, soit, comme le prévoit la théorie, celles situées en bouts de chaîne et dans les portions désordonnées. Leur nombre étant limité, l'association se stabilise assez rapidement lorsque l'acide est ajouté progressivement.

---

* Nous ne discuterons dans ce paragraphe que les résultats des mesures effectuées sur la bande amide I. Ceux concernant la bande $\nu(C=O)$ ester des chaînes latérales seront traités par la suite.

Ce résultat est à rapprocher des mesures de vitesse d'échange isotopique NH/ND effectuées sur ce polymère (112) : la vitesse d'échange, mesurable pendant une courte période initiale du temps, devient rapidement très faible. Le premier stade de l'échange est, d'après les auteurs, d'autant plus important que la masse de l'échantillon est plus faible, ce qui tend à montrer que les groupes peptidiques concernés sont en bouts de séquences hélicoïdales.

Nous avons comparé le degré de complexation de plusieurs échantillons de PBLG ($\overline{M}_w \simeq 19000, 75000, 280000, 550000$) dans les mêmes conditions expérimentales (concentration, acidité etc...), à partir de l'importance relative des bandes amide I caractéristiques de l'hélice et des complexes (I). La différence de comportement entre les polymères de masses extrêmes n'est pas très significative en raison de l'imprécision des mesures. La polydispersité n'étant pas très grande (masse en poids/masse en nombre < 1,6), il est possible que, plus que les extrêmités "carbonyle" des séquences en hélice, les résidus appartenant aux portions désordonnées des chaînes soient concernés par l'association avec l'acide. Leur importance relative ne serait alors guère différente (≃ 20 %) lorsqu'on considère un échantillonnage assez large des masses.

La courbe de complexation du PBLG que nous avons discutée (fig. 35) peut être considérée comme une courbe de transition hélice - pelote et comparée à celles obtenues par les méthodes globales. On fait ainsi correspondre l'intense complexation infrarouge au dessus de x = 0,07 (fig. 35) à la transition proprement dite telle qu'elle se présente en ORD (fig. 25) ou en viscosimètrie (114).

Mais nous avons observé (fig. 35) dès les premières additions d'acide, une première complexation dont on peut se demander si elle est liée à une modification des propriétés globales. En ce qui concerne les mesures ORD, il est difficile de dire si le paramètre d'hélicité b_0 subit une variation dans la première partie de la courbe de transition. Celle qui est représentée sur la figure 25 n'est pas suffisamment précise pour que l'on puisse en juger. Certains auteurs (73, 114, 115) ont, semble-t-il,constaté une telle modification, toutefois son importance n'est pas définie et son interprétation est encore incertaine.

On observe par contre, en viscosimétrie (114), une diminution assez sensible de la viscosité dans la première partie de la courbe de transition Ce phénomène apparaît reliable à nos résultats infrarouges. En effet on sait que les dimensions de l'hélice diminuent considérablement pour se rapprocher de celles de la pelote dès que l'hélice présente des points de rupture. La

viscosité, sensible aux variations de structure tertiaire, peut détecter ainsi, au début de la courbe de transition, la formation d'articulations entre zones hélicoïdales. De plus, dans le cas du PBLG, cette première diminution de viscosité a été attribuée à la rupture des agrégats formés, dans le solvant inerte pur, entre chaînes hélicoïdales (116). Si l'on suppose que l'agrégation met en jeu des liaisons hydrogène - CO....HN - entre chaînes différentes par l'intermédiaire de leurs zones désordonnées et (ou) par leurs extrémités d'hélices, on peut concevoir que l'addition du TFA fasse disparaître cette agrégation en substituant aux liaisons peptidiques des liaisons avec l'acide. Dans ces conditions, on a une bonne cohérence entre résultats infrarouges et viscosimétriques.

Signalons que l'on peut penser, a priori, que cette désagrégation ne modifie pas beaucoup le taux hélicoïdal des chaînes ; on comprend alors que le paramètre b_0 ne varie pas sensiblement à faible acidité.

2.3.4. - Influence de la masse des échantillons sur l'allure de la transition

Au cours des études précédentes, on a pu remarquer que le domaine de concentration en acide ou de température pendant lequel s'opère la transformation est plus ou moins large selon le polypeptide examiné. La coopérativité de la transition dépend en effet, en particulier, de la nature propre du polymère considéré.

Par ailleurs, si pour un même polymère on étudie des échantillons de divers degrés de polymérisation, on observe des différences dans les courbes de transition. Ainsi on a constaté qu'une diminution de la longueur des chaînes entraîne un étalement de la transition (61, 62, 67).

Lors de l'étude de la PLA nous avons noté que le taux de complexation dépend de la masse moléculaire moyenne des chaînes. Il est possible de préciser l'importance de ce facteur sur l'allure générale de la transition dans le cas du PBLA (fig. 32).

Les échantillons A (bas poids moléculaire) et B (haut poids moléculaire) ont été étudiés dans les mêmes conditions expérimentales en mélanges TFA - $CHCl_3$. Si la forme pelote est obtenue dans chaque cas pour la même acidité ($\simeq$ 2 %) et si les caractéristiques spectrales de cette forme sont identiques pour les deux polymères, l'évolution des bandes amide au cours de la transition et en particulier des bandes amide I (hélice et complexes (I)) diffère très sensiblement (fig. 32). Ainsi pour x = 0,01, l'association PBLA - TFA est beaucoup plus forte pour A que pour B : pour le premier, l'intensité de la bande amide I des structures en hélice est faible et comparable à celle des

complexes (I), alors que pour le second les complexes sont en très petit nombre par rapport aux formes associées intramoléculaires. Cette différence d'allure des spectres traduit bien la différence de coopérativité des transitions : pour B, il y a une fusion des chaînes dans un petit domaine de concentration en acide (1 - 2 %) et pour A, une transition plus étalée dans toute la gamme d'acidité étudiée.

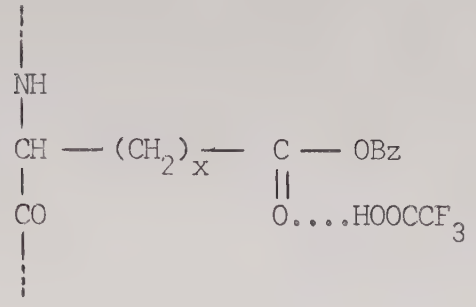
Cette différence de comportement est sans aucun doute à relier à la différence de longueur moyenne des chaînes entre les deux polymères. Bien que l'on ignore l'importance de leur polydispersité respective, il apparaît que B, qui a en moyenne les chaînes plus longues et la meilleure hélicité, présente la transition la plus accentuée. L'autre échantillon, A, contient vraisemblablement un nombre important de chaînes assez courtes et, de manière générale, un grand nombre de points d'attaque pour l'acide (bouts de chaîne, défauts...) ce qui entraîne une destabilisation initiale et continue des hélices.

2.3.5. - Etude du comportement des chaînes latérales au cours de la transition par l'analyse des bandes ν(C=O) ester

Les chaînes latérales des polypeptides précédents comportent toutes un groupement basique : thioéther ou ester. Les bandes du groupement thioéther n'étant pas observables dans les conditions d'étude, seule la fonction ester, caractérisée par la bande de vibration de valence ν(C=O) située à 1733 - 1735 cm^{-1} sur les spectres des figures 29 à 33, peut être analysée.

Sur ces figures, on constate que, par addition de TFA et en même temps que l'interaction chaîne principale - acide, se produit une interaction analogue avec les chaînes latérales, caractérisée par le remplacement progressif de la bande ν(C=O) "libre" par une bande de plus basse fréquence : environ 1705 cm^{-1} pour les polymères à chaîne glutamate (fig. 29 et 31) et 1717 cm^{-1} pour les polymères à chaîne aspartate (fig. 32).

Ce comportement est typique d'une association par pont d'hydrogène du type :



(III)

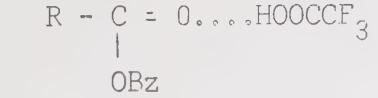
qui avait été suggérée par certaines études partielles par spectroscopie infrarouge (75,93).

On note que si l'association des chaînes ester glutamate se traduit par une séparation nette des bandes "libre" et "associée" ($\Delta\nu \simeq 25$ cm^{-1}, fig. 29 et 31), celle relative aux chaînes aspartate (fig. 32) est moins visible en raison de la plus faible valeur de l'abaissement de fréquence consécutif à l'association ($\Delta\nu = 18$ cm^{-1}). Cette différence de $\Delta\nu$ indiquerait une interaction moins forte dans le cas du PBLA que dans celui des PBLG et PBD-LG.

Bien que la basicité de la fonction thioéther soit moins forte que celle de la fonction ester, il est probable que les chaînes latérales méthionine se complexent de la même manière au TFA. Nous l'avons confirmé indirectement par l'examen d'un thioéther modèle en solution dans des mélanges TFA-$CHCl_3$. Les modifications observées sur les bandes ν(C=O) et ν(OH) de l'acide indiquent bien que le composé modèle forme avec l'acide des complexes par liaison hydrogène.

Il est intéressant de comparer les propriétés basiques de ces chaînes latérales à celles de composés modèles monomères : les acétate et propionate de benzyle respectivement représentatifs des chaînes aspartate et glutamate considérées à partir des carbones β.

Les spectres montrant l'association des esters modèles avec l'acide trifluoroacétique sont représentés sur la figure 36. Dans le chloroforme pur, la fréquence ν(C=O) des deux composés est identique et égale à celle des chaînes latérales aspartate et glutamate. La formation de complexes du type (III):



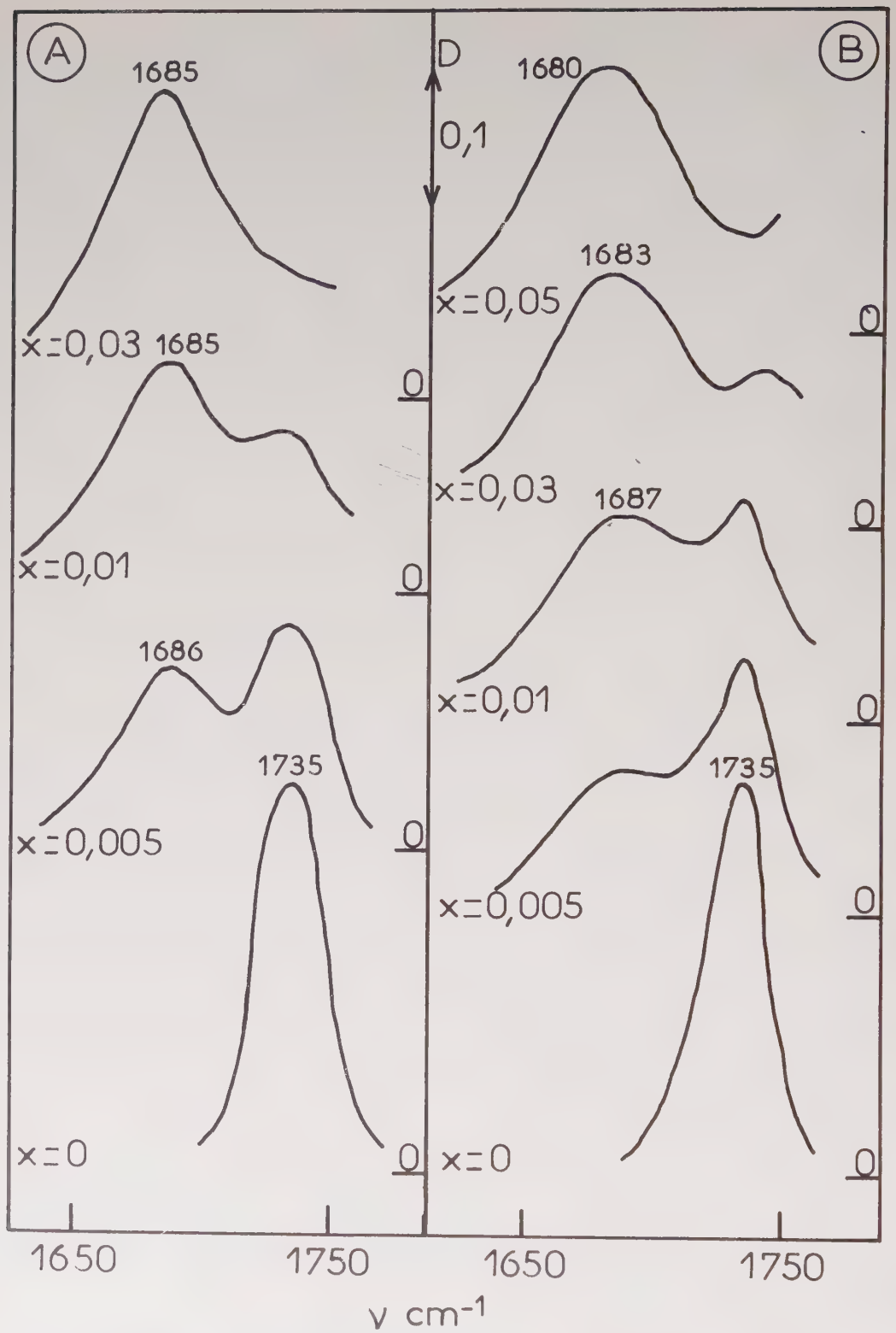


Fig. 38 Massifs d'absorption ν(C = O) de l'acétate de benzyle (A) et du propionate de benzyle (B) (0,04 M/l) dans des mélanges TFA - $CHCl_3$ (25°C) de fractions molaires (x) en acide variables.

se traduit par l'apparition d'une bande "associée" vers 1680 - 1685 cm^{-1}. Si l'abaissement de fréquence $\Delta\nu$ est d'environ 50 cm^{-1} pour les deux esters, l'association du propionate (fig. 36B) est moins rapide que celle de l'acétate (fig. 36A). Cette différence de constante d'association est en bon accord avec un résultat analogue de GRAMSTAD (117) dans le cas des acétate et propionate d'éthyle liés au phénol.

En comparant les $\Delta\nu$ observés à ceux obtenus avec les polypeptides, on voit que le passage des modèles aux polymères réduit la basicité dans un rapport supérieur ou égal à 2. Cette constatation n'est pas surprenante ; nous l'avons déjà faite dans la première partie de ce mémoire dans le cas d'un polyacrylamide atactique. Nous pouvons donc attribuer, au moins en première approximation, la réduction de basicité des fonctions esters des chaînes glutamate et aspartate au fait qu'elles se situent dans un environnement macromoléculaire sans considérer explicitement la conformation du polymère.

Toutefois si l'on examine de plus près, pour chaque polymère, l'allure de la complexation de type (III) qui s'opère simultanément à celle de type (I) lorsque la concentration en acide des solutions augmente, on peut faire certaines remarques. Pour le PBLG (fig. 29), au contraire des complexes (I), les complexes (III) se forment progressivement selon une loi d'équilibre apparemment simple. On constate d'ailleurs l'existence d'un point isobestique en superposant les spectres des bandes ν(C=O) ester. L'allure de cette association est en outre précisée par les mesures quantitatives effectuées sur la bande ν(C=O) ester "libre" parallèlement aux mesures du taux de complexation de la chaîne principale (fig. 35) : le rapport $\frac{C}{C_o}$ des carbonyles ester "libres" décroît de façon continue au contraire de celui caractéristique des carbonyles amide. Au delà d'une fraction molaire en acide $x = 0,02$ les mesures de densité optique deviennent imprécises en raison de l'absorption croissante du TFA mais on peut raisonnablement penser que le processus d'association des chaînes latérales n'est pas perturbé. Avant la transition, pour $x = 0,08 - 0,09$ (fig. 29) la majorité des chaînes latérales apparaît solvatée par l'acide alors que, rappelons-le, un petit nombre seulement de complexes (I) sont distinguables. Ceci est en accord avec un résultat RMN de SILVERMAN et coll. (96) montrant de manière indirecte que l'état de solvatation des chaînes latérales n'est pas perturbé au cours de la transition du PBLG.

En ce qui concerne le copolymère D-L alterné (fig. 31), moins stable que le précédent, la pelote est obtenue alors qu'un certain nombre de chaînes latérales n'interagissent pas encore avec l'acide (cf. x = 0,04). Cette association se poursuit par addition supplémentaire d'acide comme l'indique le spectre obtenu pour x = 0,05. Toutefois, si l'on compare à cette concentration en acide les rapports d'intensité des bandes ν(C=O) ester "libre" et "associée" du PBLG (fig. 29) et du PBD-LG (fig. 31), il semble que le taux de complexation du copolymère en pelote soit supérieur à celui de l'homopolymère en hélice. Il est difficile de préciser davantage le degré de complexation respectif de chaque polypeptide en raison des conditions expérimentales défavorables.

Cette différence de comportement peut être due tout d'abord à une différence de configuration des résidus dans les enchaînements L-L-L--- et D-L-D--- ; elle peut aussi être liée à la conformation (hélice ou pelote) de la chaîne principale et dans ce cas, cela suggèrerait que le pouvoir accepteur de proton des chaînes glutamate n'est pas indépendant de la structure secondaire du polymère.

Nous allons pouvoir préciser cet aspect particulier de la complexation des chaînes latérales au cours de la transition hélice - pelote par l'examen du comportement des chaînes aspartate. Sur les figures 32 et 33 on voit en effet que la formation de complexes (III) se fait en même temps que la désorganisation de l'hélice ; elle semble même s'effectuer de façon coopérative avec la transition puisque, au contraire du PBD-LG (fig. 31), toutes les chaînes latérales du PBLA s'associent à l'acide lorsqu'on obtient la pelote. En outre, si l'on compare les spectres pour x = 0,01 des deux échantillons de PBLA (fig. 32A et 32B), on voit que le taux de complexation ester est fonction du taux de pelote en solution : pour A dont la plupart des hélices sont désorganisées, la majeure partie des chaînes latérales est associée au TFA alors que pour B principalement hélicoïdal, les chaînes latérales sont essentiellement libres. Le pouvoir accepteur de proton des fonctions ester semble donc, dans le cas présent, particulièrement lié à l'état conformationnel de la chaîne principale.

Ces résultats montrent que les chaînes latérales polaires interagissent avec l'acide par formation de complexes par liaison hydrogène et que l'importance de cette interaction est fonction de la structure secondaire du polymère. Plus précisément, le pouvoir accepteur de proton des sites basiques de ces chaînes latérales semble plus accentué lorsqu'elles se trouvent dans des zones désordonnées du polypeptide que dans des zones hélicoïdales. Ceci

apparaît d'autant plus net que la chaîne latérale est plus courte comme le montre la comparaison glutamate - aspartate.

L'origine de ce comportement est liée à l'existence, dans la structure ordonnée des polypeptides, d'interactions entre chaînes latérales ou entre chaînes principale et latérales, interactions supprimées ou perturbées dans la conformation désordonnée. Elles sont plus ou moins fortes selon la nature de la chaîne latérale et, dans le cas présent, de sa longueur.

Divers travaux théoriques et expérimentaux ont été réalisés afin d'évaluer ces interactions et de là les conformations possibles des chaînes latérales autour des hélices. On y relève quelques conclusions intéressantes pour notre étude. D'une manière générale, on note que l'organisation des chaînes latérales glutamate et aspartate n'est pas quelconque. Ainsi, dans le cas du PBLG hélicoïdal, SILVERMAN et coll. (96) ont montré par RMN que les substituants latéraux sont étendus dans le milieu environnant ($CHCl_3$ - TFA). Ils notent l'existence d'interactions non liées entre noyaux phényl régulièrement empilés et proposent pour les chaînes latérales une organisation hélicoïdale autour de l'hélice principale.

Dans le cas du PBLA les auteurs précédents ne trouvent pas de conformation analogue (118) ; toutefois ils n'excluent pas que les chaînes aspartate adoptent une organisation préférentielle, ce qui est confirmé par BRADBURY et coll. (119) qui, toutefois, ne peuvent la préciser. Cette structure doit essentiellement résulter, au contraire du cas précédent, d'interactions chaînes latérales - chaîne principale. En effet GOVIL (120) a montré théoriquement que c'est seulement à partir du carbone δ de la chaîne latérale que la conformation de cette dernière peut être considérée comme indépendante de celle de la chaîne principale. Par ailleurs d'autres travaux théoriques (121, 122) ont relié la préférence à l'hélice gauche de certains polyaspartates à l'existence d'interactions dipolaires entre groupes amide et ester. Enfin la construction de modèles spatiaux montre que seuls deux ou trois rotamères autour de la liaison C_α - C_β sont possibles pour les chaînes latérales du PBLA hélicoïdal (119).

Ces conclusions nous permettent d'analyser un peu mieux nos résultats. L'existence d'une organisation des chaînes latérales autour des hélices et donc d'interactions entre chaînes latérales ou entre chaînes latérales et principale peut affecter à divers degrés le pouvoir complexant des carbonyles ester. La destabilisation des hélices entraînant celle des chaînes latérales, les interactions sont perturbées ou même supprimées à la transition. On conçoit alors très bien que le pouvoir accepteur de proton des sites basiques

situés sur les substituants latéraux ne soit pas le même dans les conformations hélice et pelote des polypeptides. Il est probable que ce pouvoir est plus élevé dans la structure désordonnée que dans la structure ordonnée ; c'est au moins ce que suggèrent nos résultats expérimentaux, en particulier ceux concernant le PBLA. Pour ce dernier polymère, cet effet conformationnel apparaît plus important que pour les polymères à chaînes glutamate ; ceci doit être relié aux fortes interactions chaînes latérales - chaîne principale qui existent dans ce polymère.

2.3.6. - Discussion de la théorie de la transition

En fonction des résultats qui viennent d'être présentés, il apparaît intéressant de discuter le modèle théorique généralement choisi par les auteurs pour traiter l'influence du solvant associant sur la transition. Il est possible, en effet, de préciser les hypothèses envisagées par PELLER (69), par exemple, concernant l'interaction polypeptide - solvant.

L'auteur fait l'hypothèse de départ que l'acide interagit par liaison hydrogène avec les motifs peptidiques (non liés) des zones désordonnées des chaînes et (simplement liés) des extrémités hélicoïdales. L'ensemble de nos résultats, en particulier ceux obtenus avec le PBLG, vérifient assez bien cette idée. Signalons toutefois que l'auteur considère une chaîne isolée alors que les solutions étudiées en infrarouge contiennent éventuellement, au départ, des agrégats de chaîne ; l'interprétation que nous avons donnée de nos résultats en fonction de cette agrégation ne modifie cependant pas fondamentalement le concept de base de l'auteur.

Ce dernier a en outre supposé que le donneur de proton s'associe aux groupements peptidiques accessibles aussi bien sur leurs sites CO et NH et posé $K_{CO} = K_{NH}$. Or, nous avons montré que ce sont les sites CO qui sont principalement mis en jeu ; les sites NH ne semblent pas, en effet, être le siège d'une association du même type et si, en tout état de cause, cette dernière n'est pas à éliminer complètement, il est néammoins très peu probable qu'elle soit de la même importance que la première. Signalons que BIXON et coll. (123) envisagent, d'une manière générale, que ces constantes puissent avoir des valeurs différentes. Toutefois, en l'absence d'information précise sur leur importance relative, ils montrent que l'on peut choisir divers couples de constantes permettant de faire coïncider les résultats expérimentaux et théoriques et en particulier le couple $K_{CO} = K_{NH}$.

Enfin aucun des auteurs précédents ne fait intervenir une complexation du milieu avec les chaînes latérales dans le calcul de l'énergie du polymère en présence de solvant associant. Signalons toutefois que SCHELLMAN (68) fait une courte allusion à la possibilité de généraliser l'interaction de l'acide à l'ensemble chaîne principale - chaîne latérale.

Nous avons bien mis en évidence une telle complexation par liaison hydrogène entre les fonctions polaires portées par les chaînes latérales et l'acide. De plus, la constante d'association dépend, à travers les divers types d'interaction qui peuvent s'établir, de la structure du polypeptide. Finalement, une justification théorique précise de la transition induite par association préférentielle devrait peut-être en tenir compte.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA CONFORMATION DES POLYPEPTIDES EN MILIEU ALCOOLIQUE

Nous venons de voir de quelle manière la présence dans les solutions de polypeptides, d'un acide carboxylique fort, peut provoquer la transition de conformation hélice - pelote des chaînes de polymère. Nous allons effectuer maintenant une étude analogue en remplaçant l'acide par un donneur de proton moins fort : l'hexafluoroisopropanol (HFIP), solvant très utilisé pour les études conformationnelles des polypeptides et proteines en raison de sa bonne transparence dans la plupart des régions spectrales intéressantes. La majorité des travaux qui ont été réalisés avec cet alcool montrent que les polypeptides adoptent, dans ce milieu, une conformation hélicoïdale (113, 124, 125). En fonction de nos résultats précédents, il apparaît intéressant d'essayer de voir s'il s'établit des interactions spécifiques entre les polymères et HFIP.

2.4.1. - Etude de la poly - L - alanine

La figure 37 rassemble les spectres enregistrés dans les régions 3200 - 3500 cm^{-1} (A) et 1500 - 1700 cm^{-1} (B) de la PLA en solution dans HFIP pur ou dans un mélange HFIP 40 % - $CHCl_3$. La fréquence de la bande amide I est d'environ 1645 cm^{-1} (fig. 37B), soit abaissée d'environ 10 cm^{-1} par rapport au chloroforme ; de plus sa demi-largeur est approximativement doublée : 45 cm^{-1} au lieu de 20-25 cm^{-1}. Ces modifications suggèrent que l'état d'interaction des groupes C=O de la PLA est perturbé par le milieu alcoolique. Ceci est confirmé et précisé par l'examen de la région ν(OH) de l'alcool (fig. 37A) : à 3600 et 3450 cm^{-1} environ (courbe en pointillés) se situent les bandes ν(OH) "libre" et "associée" de l'alcool (faiblement autoassocié) ; la présence du polypeptide (courbe en trait plein) diminue l'intensité de ces bandes et en

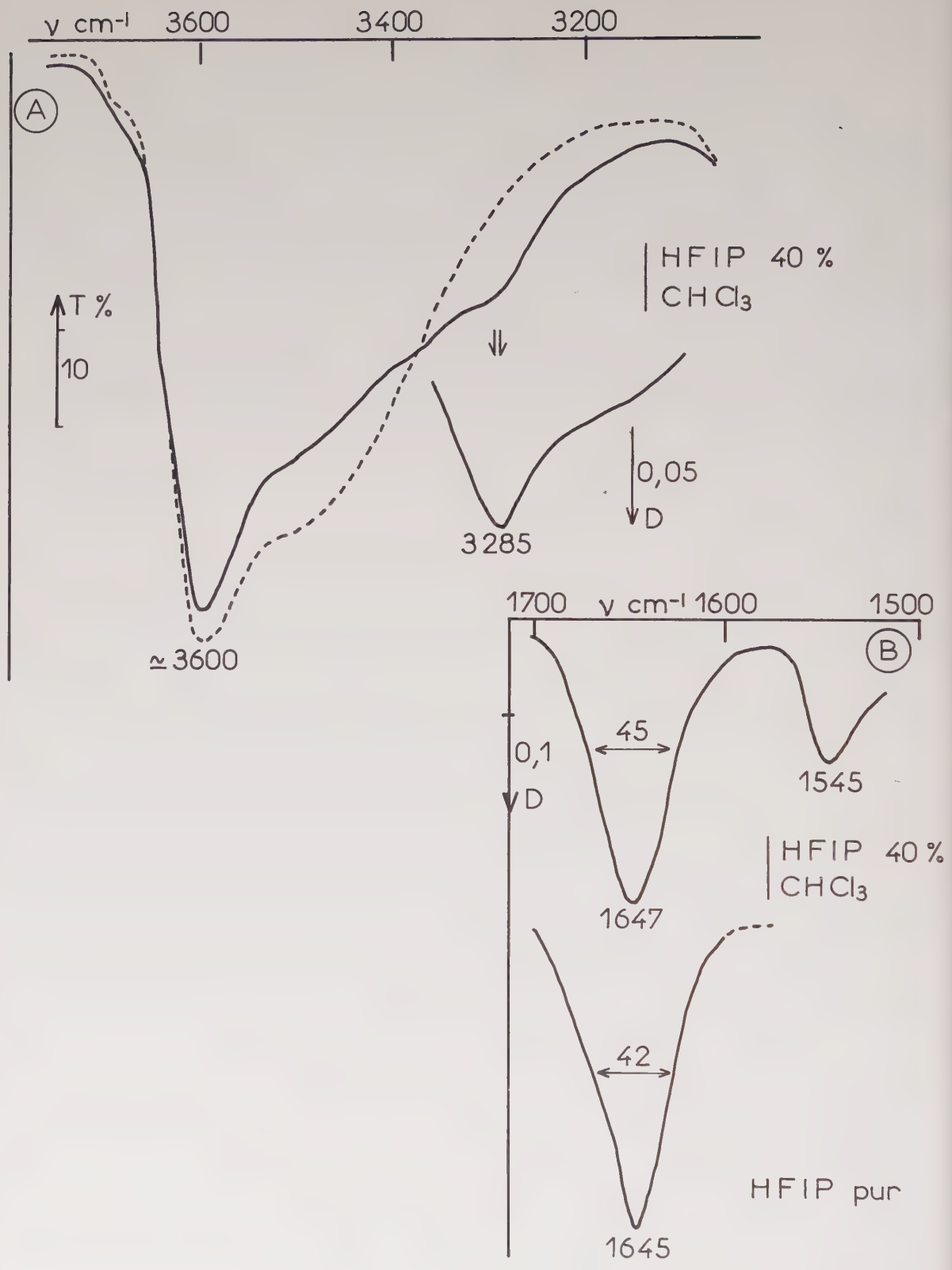
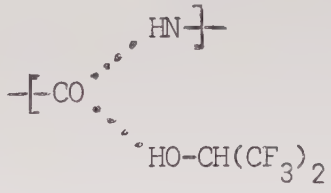


Fig. 37 Etude de la PLA (0,04- 0,16 M-g/l) en mélanges HFIP - $CHCl_3$. A : région ν(OH), ν (NH), B : région ν(C = O).
----- mélange de solvants en absence de polymère.

particulier de la bande ν(OH) "libre." Il faut donc envisager que HFIP s'associe à la chaîne polypeptidique par l'intermédiaire des groupes carbonyle amide. Toutefois, au contraire de ce qui se passe avec l'acide trifluoroacétique, la formation de cette liaison hydrogène intermoléculaire ne provoque pas l'effondrement de l'hélice α : on observe en effet la vibration ν(NH) du polymère à 3285 cm^{-1} environ (fig. 37A), fréquence caractéristique de la structure en hélice . Signalons que l'épaulement situé vers 3150 cm^{-1} est peut être dû à la vibration ν(OH) de l'alcool associé à la PLA.

PARRISH et coll. (125) ont effectué une étude de la PLA en présence de HFIP par diverses techniques (ORD, CD, UV, IR). Ils concluent que ce polypeptide adopte une conformation hélicoïdale de type α déformée par l'établissement d'une liaison hydrogène supplémentaire sur les groupes carbonyle amide qui se trouvent alors doublement liés :



Cette liaison hydrogène supplémentaire s'établit grâce au faible encombrement de la chaîne latérale méthyle et provoque une variation des angles ϕ et Ψ de l'hélice α classique, tendant à dégager les groupes carbonyle.

Leurs spectres infrarouges sont toutefois obtenus dans d'assez mauvaises conditions : ils utilisent HFIP pur (donc très absorbant dans la région 3600 cm^{-1}) et une épaisseur de cellule telle que l'énergie transmise est très faible ; de plus l'enregistrement des spectres est fait en compensation du solvant, ce qui constitue une technique d'utilisation délicate.

La structure proposée est néammoins confirmée par nos résultats et aussi cohérente avec la possibilité qu'a le groupe carbonyle d'accepter deux liaisons hydrogène en solution (5).

2.4.2. - Etude des polypeptides à chaînes latérales polaires

L'examen du spectre de la PLM en présence de HFIP montre que l'alcool n'interagit pas avec la chaîne peptidique : les caractéristiques spectrales des bandes amide sont inchangées par rapport à la solution chloroformique. En accord avec un travail récent (124), nous pensons que ce polypeptide conserve dans HFIP une structure α hélicoïdale classique. Il est toutefois possible que les

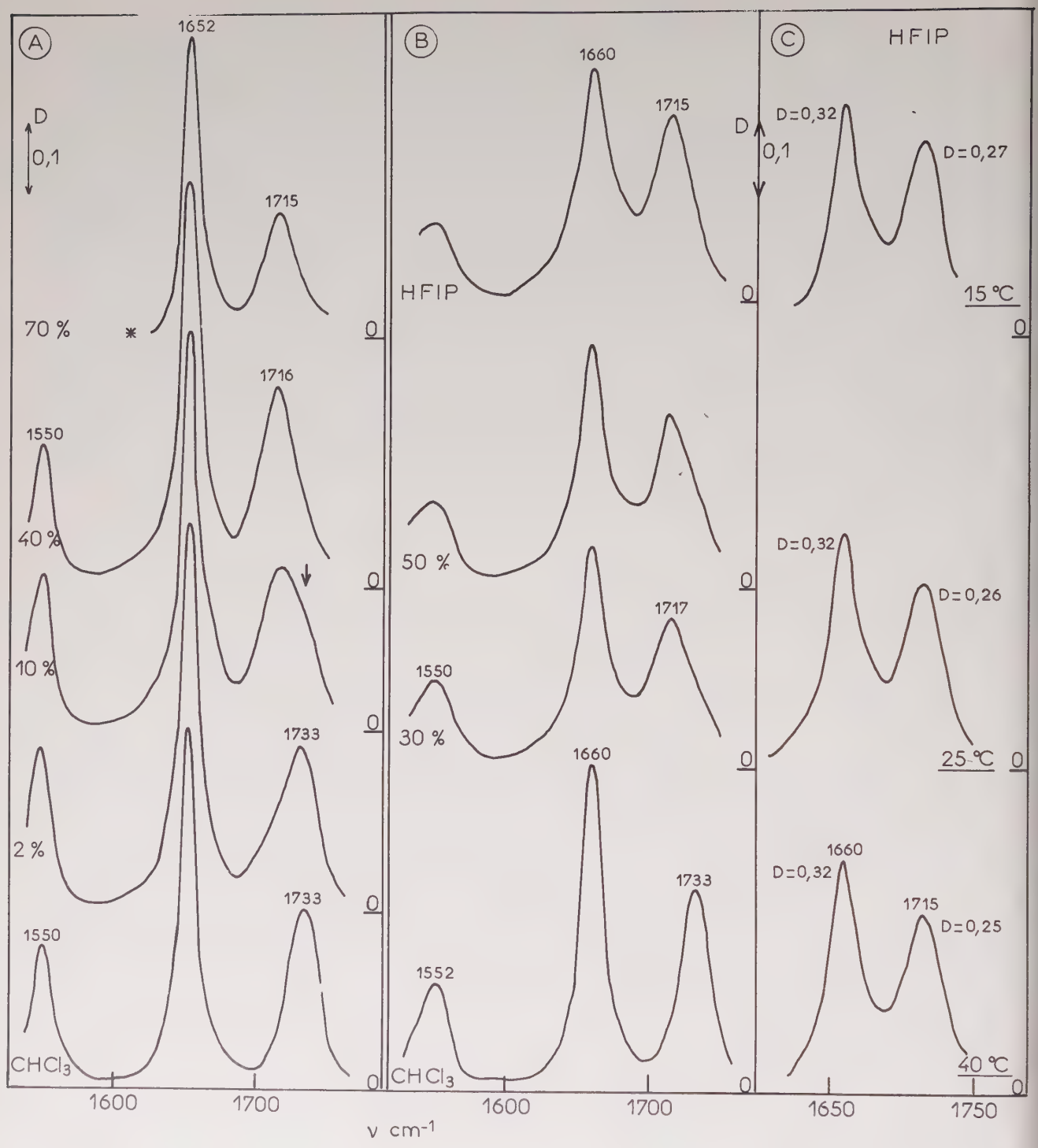


Fig. 38 Etude des PBLG (A) et PBD-LG (B,C) (≃ 0,03 M-g/l) en mélanges HFIP (V/V %) - $CHCl_3$ dans la région ν(C = O). A et B : pourcentages d'alcool variables (25°C). C : température variable.

* PBLG ≃ 0,02 M-g/l

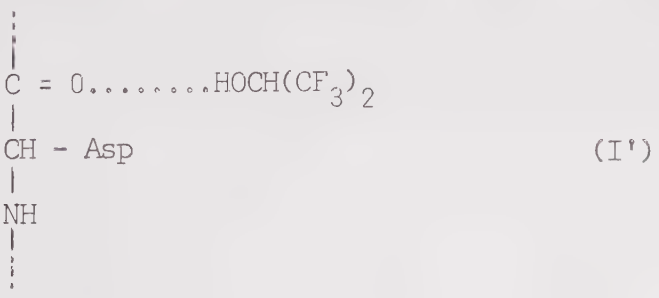
chaînes latérales s'associent à l'alcool par leur groupe thioéther.

Les figures 38 et 39 rassemblent les résultats obtenus avec les PBD-LG et PBLG (fig. 38) et PBLA (fig. 39) en mélanges HFIP - $CHCl_3$ de teneurs en alcool croissantes.

L'examen du comportement de la bande amide I de ces polymères nous renseigne sur leur état conformationnel. Dans le cas des polymères à chaînes latérales glutamate, les caractéristiques de la bande amide I, en particulier sa fréquence (1652 cm^{-1} ou 1660 cm^{-1}), restent inchangées par additions successives d'alcool (fig. 38). Celui-ci n'interagit donc pas avec la chaîne principale peptidique. Le PBLG et le PBD-LG conservent dans HFIP une conformation α hélicoïdale très proche de celle existant dans le chloroforme. Dans le cas du copolymère (fig. 38B), signalons que l'intensité au maximum de la bande amide I (1660 cm^{-1}) diminue légèrement dès la première addition d'alcool (30 %) mais se stabilise par la suite ; ceci doit être probablement attribué à la désorganisation initiale de chaînes courtes (l'échantillon est de faible masse). La majeure partie des chaînes restent toutefois hélicoïdales comme le montre le spectre de la solution dans HFIP pur. Un effet de température sur cette solution (fig. 38C) confirme cette conclusion : une variation de 25°C ne change pas l'intensité de la bande amide I.

Ces résultats sont en bon accord avec certains travaux effectués par diverses techniques sur des systèmes analogues. Ainsi PARRISH et coll. (124) ont montré que le poly - L, γ - glutamate de méthyle a une structure en hélice dans HFIP. HEITZ et coll. (98) ont conclu que la conformation du PBD-LG en solution dans le m-crésol est hélicoïdale et qu'elle n'est pas altérée par effet de température.

L'analyse du comportement de la bande amide I du PBLA (fig. 39) conduit à une toute autre conclusion : à mesure que le pourcentage d'alcool augmente, la densité optique de cette bande diminue, sa fréquence se déplace à 1670 cm^{-1} dans l'alcool pur et elle s'élargit. Ces changements sont incontestablement dus à une interaction chaîne peptidique - alcool du type :



(I')

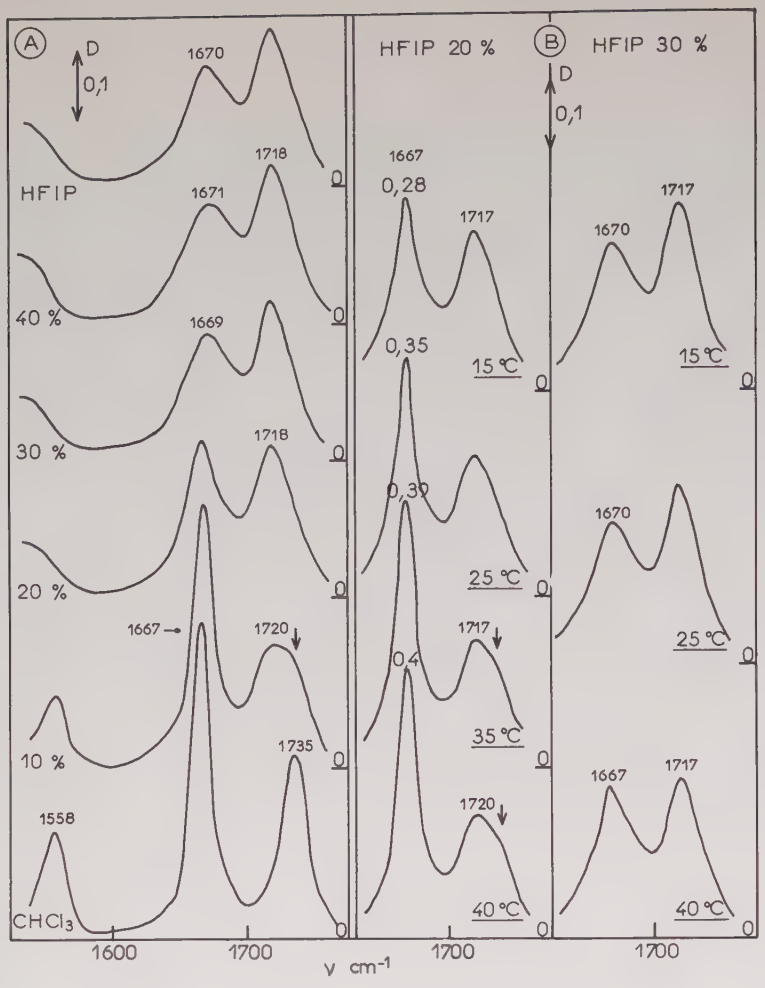


Fig. 39 Etude du PBLA (≃ 0,03 M-g/l
(A : $\bar{M}_W$ faible, B : $\bar{M}_W$ ≃ 15
dans des mélanges HFIP (V/V
- $CHCl_3$ dans la région ν(C =
A : pourcentages d'alcool va
riables (25°C) B : températu
variable.

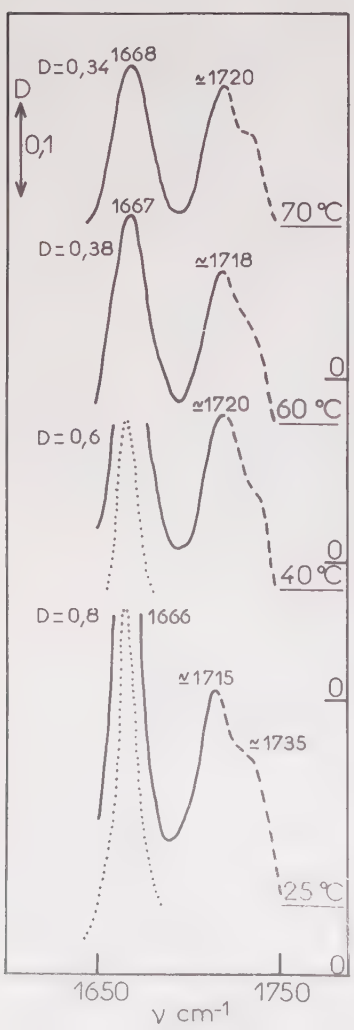


Fig. 40 Influence de la température sur le massif d'absorption ν(C = O) du PBLA ($\bar{M}_W$ ≃ 150 000) à ≃ 0,06 M-g/l dans le m-crésol.

..... courbes en D/2

----- imprécision due au solvant

Toutefois, au contraire de la PLA, on observe pour ce polymère une augmentation de la fréquence amide I (≃ 3 cm^{-1}) au lieu d'une diminution. Ceci doit être attribué au fait que l'état d'interaction des groupes C=O amide de la PLA et du PBLA diffèrent dans HFIP. Si pour le premier nous avons conclu à la coexistence des liaisons hydrogène intra - et intermoléculaires, pour le second il apparaît que la liaison hydrogène peptidique est remplacée par celle avec l'alcool. Il en découle que, contrairement aux polymères précédents, le PBLA subit dans les mélanges HFIP - $CHCl_3$ une transformation de la forme hélice à la forme pelote entièrement associée à l'alcool, transition analogue à celle précédemment observée dans les mélanges acides. Le spectre de la pelote en solution dans l'alcool pur est d'ailleurs tout à fait comparable à celui de la même forme en solution dans le mélange TFA 2 % - $CHCl_3$ (fig. 32), à la différence de fréquence de la bande amide I prés : 1670 cm^{-1} pour l'alcool, 1652 cm^{-1} pour l'acide, écart à relier à la force moins grande de la liaison hydrogène dans les complexes (I') par rapport aux complexes (I). Notons enfin que la fréquence de la bande amide II (1558 cm^{-1}) (fig. 39A), bien qu'imprécise en raison de la mauvaise transparence du solvant, semble baisser par addition d'alcool, ce qui confirme notre interprétation.

La réversibilité de cette transition avec la température est vérifiée sur la figure 39B. Deux concentrations d'alcool ont du être utilisées étant donné la difficulté d'obtenir, avec un seul mélange, l'ensemble des variations spectrales intéressantes dans le domaine accessible des températures (0 - 40°C), difficulté provenant de la faible coopérativité de la transition du PBLA dans HFIP. Le mélange à 20 % d'alcool montre que le refroidissement favorise l'action de l'alcool sur la chaîne peptidique. Celui à 30 % permet de mettre en évidence la forme pelote stable aux basses températures. On note ainsi que la transition est exothermique ou de type "inversé" comme avec l'acide trifluoroacétique.

On ne relève pas, dans la littérature, d'étude conformationnelle du PBLA en solution dans HFIP. Par contre, on sait (98, 112, 126) qu'en présence de m-crésol et dans certaines conditions de température, ce polymère subit la transformation hélice - chaîne statistique. Il y a toutefois une différence essentielle dans le mode de destabilisation de l'hélice dans ces deux solvants en fonction de la température : la courbe ORD du PBLA en solution dans le m-crésol (112, 126) montre que, à température ordinaire, la conformation stable est l'hélice et que la pelote est obtenue par chauffage (≃ 50°C) au contraire de HFIP (fig. 39B). Cette transition endothermique est illustrée par spectroscopie infrarouge sur la figure 40 : les spectres sont relatifs à un mélange PBLA - m-crésol porté à des températures croissantes. A 25°C, le polymère est

hélicoïdal comme en témoignent la position (1665 cm^{-1}) et l'intensité de la bande amide I. A température plus élevée, cette bande s'affaiblit fortement et s'élargit pour se stabiliser vers 70°C. Cette évolution qui est réversible correspond à la modification de l'état d'interaction des groupes C=O amide au cours de la transformation hélice - pelote. Le remplacement de la liaison hydrogène peptidique par la liaison hydrogène avec le m-crésol ne perturbe pratiquement pas la fréquence amide I (≃ 1667 cm^{-1}), comme dans le cas de la transition obtenue avec HFIP.

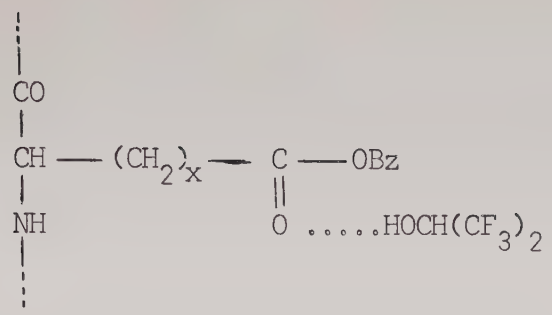
Cependant les grandeurs thermodynamiques caractéristiques des complexes formés avec ces deux donneurs doivent différer suffisamment pour que la transition thermique du PBLA soit opposée dans les deux solvants. En effet, contrairement à la transition dans HFIP, celle qui s'effectue dans le m-crésol est "normale" (c'est-à-dire que l'hélice est la forme de plus basse énergie et la pelote celle de plus haute entropie). D'après la relation |9| précédemment discutée:

$$\text{signe de } \left(\frac{dX_c}{dt}\right) = \text{signe de } \left(\Delta H^\circ + \frac{2Ka}{1+Ka}\,\Delta H_b\right)$$

l'importance de K et ΔH_b dans le cas du m-crésol doit être insuffisante pour que le terme en $\Delta H_b < 0$ l'emporte sur le terme en $\Delta H^\circ > 0$, au contraire des valeurs correspondantes dans le cas de HFIP.

Ces derniers résultats illustrent et vérifient l'interprétation thermodynamique de la transition induite par association préférentielle dont le développement fait intervenir les grandeurs caractéristiques de l'interaction par liaison hydrogène polymère - solvant.

Enfin les figures 38 et 39 permettent aussi d'étudier le comportement des chaînes latérales glutamate et aspartate en présence d'alcool. Que la structure en hélice des polymères soit conservée ou pas, par additions successives de HFIP, la bande ν(C=O) ester (1733 - 1735 cm^{-1}) est progressivement remplacée par une bande à 1715 - 1718 cm^{-1}. Dans le cas du PBLA (fig. 39), ceci se produit en même temps que la transition de conformation du polypeptide. On peut attribuer cette modification de fréquence à la formation de complexes par liaison hydrogène du type :



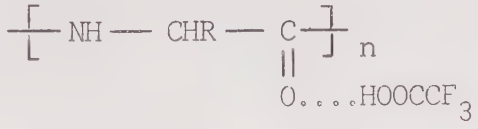
(III')

Ceci a d'ailleurs pu être vérifié par l'examen de la vibration ν(OH) de l'alcool.

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Au cours de cette deuxième partie, notre travail a porté sur la mise en évidence des interactions spécifiques jouant un rôle dans la transformation de conformation "hélice α - pelote statistique" de quelques polypeptides en milieux donneurs de proton. Les résultats ont été discutés en fonction des hypothèses classiques de la théorie du phénomène de transition et aussi en relation avec les travaux expérimentaux effectués, en particulier, par les méthodes globales.

En choisissant, dans un premier temps, un polypeptide à chaîne latérale simple (poly - L - alanine) et un amide modèle (N-méthylacétamide) en mélanges acide carboxylique - solvant inerte, nous avons montré que l'acide interagit avec le squelette peptidique par liaison hydrogène et non par protonation. Ce résultat est en désaccord avec les conclusions de nombreuses études expérimentales, notamment infrarouges, que nous avons pu ainsi critiquer; il confirme néammoins le modèle d'interaction polypeptide - donneur de proton suggéré par d'autres travaux, en particulier théoriques. Cette association polymère - acide entre en compétition avec les liaisons hydrogène intramoléculaires de l'hélice et provoque la désorganisation des chaînes. La structure des complexes formés est du type (I) :



en accord avec les hypothèses des théoriciens ; toutefois, au contraire de ces derniers, nous n'envisageons que de manière très improbable, d'après nos résultats, une association analogue entre groupes NH peptidiques et C=O acides.

Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge et par dispersion rotatoire optique (ORD) pour deux échantillons de masses très différentes de poly - L - alanine. Nous avons montré l'existence d'une assez bonne relation entre le taux de complexation (I) observé par infrarouge et le taux d'hélicité mesuré par ORD. Toutefois les échantillons étant relativement polydispersés, il est difficile d'analyser plus préci-

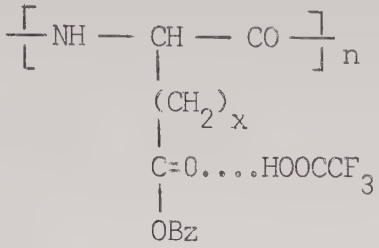
sément cette correspondance. En outre, la polydispersité, ainsi que la stabilité très forte des hélices des chaînes les plus longues, ne permettent pas d'illustrer les caractéristiques principales de la transition hélice - pelote et en particulier son aspect coopératif.

Par contre, l'examen de polypeptides à chaînes latérales "polaires" du type ester et thioéther, soit les (poly) :- L-méthionine, -(L,γ) - et - (D, L, γ) - glutamate de benzyle et - (L, β) - aspartate de benzyle, étudiés dans les mêmes mélanges organiques acides, a mis en évidence sur les spectres infrarouges, par comparaison avec les courbes de transition ORD, la coopérativité de la transformation hélice - pelote ainsi que la plupart de ses caractéristiques bien connues : réversibilité, exothermicité (transitions "inversées"), influence de la longueur des chaînes sur la coopérativité et du sens d'enroulement de l'hélice sur sa stabilité. Les formes "hélice" et "pelote" des chaînes sont clairement distinguées sur les spectres grâce à l'analyse des principales bandes amide.

Avec des échantillons de poly - L, γ-glutamate de benzyle peu polydispersés, il a été possible d'analyser plus précisément l'association (I) de l'acide avec le polypeptide. Il y a une forte augmentation de la complexation à la transition montrant que toutes les fonctions amide sont associées à l'acide dans les chaînes en pelote. Néammoins nous avons observé dès les premières additions d'acide, loin des conditions de transition, l'apparition d'une complexation initiale qui se stabilise rapidement lorsque 20 % environ des résidus ont fixé une molécule du donneur de proton. Nous avons rapproché cette complexation de la chute initiale de viscosité qui est observée pour ce polymère dans des conditions semblables d'acidité. L'apparition simultanée de ces deux phénomènes nous a suggéré une interprétation dans laquelle le rôle de l'acide, à ce stade de l'étude, serait de détruire les agrégats formés entre chaînes hélicoïdales en substituant aux liaisons hydrogène inter-chaînes des liaisons chaîne - acide (I).

L'interprétation d'ensemble de nos spectres suggère par ailleurs, en accord avec la théorie, que l'acide interagit, lorsque le polypeptide est en majeure partie hélicoïdal, avec des zones privilégiées des chaînes. Ce sont les zones désordonnées entre séquences en hélice et les extrêmités de ces hélices dont les résidus possèdent des groupes C=O et NH "libres". Toutefois les théoriciens attribuent à ces sites des propriétés complexantes identiques, alors que notre étude montre que seule la constante d'association des sites carbonyle est à considérer.

L'examen des spectres des chaînes latérales a en outre montré qu'elles interagissent avec l'acide en formant des complexes par liaison hydrogène mettant en jeu les fonctions ester ou thioéther, soit par exemple :



(III)

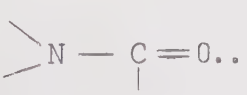
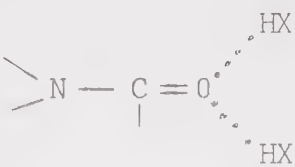
Cette association, simultanée à celle de la chaîne principale, est en outre plus ou moins importante selon la conformation de la chaîne peptidique : la constante d'association des sites accepteurs de proton des chaînes latérales semble plus forte lorsque le polymère est en pelote que lorsqu'il est en hélice. Cette différence est davantage marquée pour la chaîne aspartate, plus courte, que la chaîne glutamate, ce qui peut être relié à la conformation des chaînes latérales autour de l'hélice et par conséquent aux divers types d'interactions qui tendent à s'établir selon le cas. Cette complexation des chaînes latérales avec le milieu acide, plus ou moins sensible selon que les chaînes de polypeptide sont ordonnées ou non, n'avait pas été envisagée à notre connaissance. Elle mériterait d'être introduite dans la théorie du phénomène de transition.

Enfin nous avons analysé la conformation des polypeptides précédents dans des mélanges hexafluoroisopropanol - chloroforme. Cet alcool, moins bon donneur de proton que l'acide carboxylique, favorise davantage les formes hélicoïdales. Toutefois on peut observer, soit une déformation d'hélice (c'est le cas de la poly - L - alanine pour laquelle les liaisons hydrogène carbonyle - alcool se superposent aux liaisons peptidiques de l'hélice), soit une transformation hélice - pelote (c'est le cas du poly - L, β - aspartate de benzyle). On note que dans ce cas la transition est exothermique comme avec l'acide alors que si l'on remplace l'alcool fluoré par le m-crésol, la transition est endothermique ; ceci illustre l'importance des grandeurs thermodynamiques caractéristiques de l'interaction polymère - milieu dans l'obtention de la transition "hélice - pelote".

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

L'objet essentiel de ce mémoire a été d'étudier les différents états de solvatation de polymères acido - basiques en solution dans des milieux donneurs de proton. Notre travail a porté en premier lieu sur un polyacrylamide N-disubstitué atactique dont la structure en solution est probablement celle d'une pelote statistique. En second lieu nous avons choisi quelques polypeptides qui peuvent être, en solution, soit en hélice, soit en pelote, les interactions moléculaires jouant, dans ce cas, un rôle important pour provoquer le changement de conformation. Comme technique, nous avons utilisé la spectrométrie de vibration qui se prête bien à la mise en évidence des interactions spécifiques du type liaison hydrogène. Nous avons systématiquement mené l'étude parallèle des polymères et d'amides modèles figurant aussi fidèlement que possible l'unité séquentielle des chaînes. Cela nous a permis d'une part, d'établir à partir de l'étude des petites molécules, des critères utilisables pour l'interprétation des spectres des polymères, d'autre part, de comparer les propriétés acido - basiques de chaque séquence macromoléculaire à celle des composés modèles.

L'étude du polyacrylopipéridide et d'amides tertiaires a fait l'objet de la première partie de ce travail. Nous avons montré que le groupement carbonyle des chaînes est moins basique que celui des composés modèles. Ce résultat a pu être obtenu d'une part de manière qualitative, en comparant les déplacements de fréquence et l'allure des spectres en fonction du taux de donneur de proton ajouté ; on note ainsi que si les petites molécules peuvent former avec les alcools, les halogénoformes ou l'acide acétique des complexes par liaison hydrogène de type :

1 : 1 :  (I) et 1 : 2 :  (C),

les motifs du polymère ne donnent que difficilement des complexes 1 : 1. D'autre part, une détermination des constantes d'association des amides modèles et de la constante moyenne du polymère dans le cas de complexes 1 : 1 formés avec des réactifs électrophiles (iode, phénols) indique que cette dernière est environ deux fois plus faible que celles des petites molécules.

Nous avons montré, par ailleurs, qu'en milieu très acide (trichloro - et trifluoroacétique) on peut mettre en évidence par spectroscopie infrarouge, dans le cas des amides tertiaires, le phénomène de protonation de la fonction amide selon la réaction d'équilibre :

$$\text{(I)}\quad \rangle N - \underset{|}{C} = O \ldots HOOCCX_3 \rightleftarrows \rangle N^{(+)} = \underset{|}{C} - OH,\ {}^{(-)}OOCCX_3 \quad \text{(II)}$$

Le transfert de proton n'est pas observé dans le cas du polymère qui ne forme que des complexes (I) avec ces acides, ce qui confirme la faible basicité de ses fonctions amide.

Cette faible basicité relative est à relier aux conformations adoptées par les chaînes en solution. Nous avons ainsi mis en évidence des interactions dipolaires entre groupes carbonyle d'une même macromolécule, interactions qui atténuent vraisemblablement le pouvoir donneur d'électrons intrinsèque de chaque site.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'étude de la nature des interactions spécifiques qui interviennent entre un solvant donneur de proton et un polypeptide en conformation hélice ou pelote, dans le but de préciser le rôle de ces interactions lors du phénomène de transition de structure.

Préalablement à l'exposé de nos résultats expérimentaux, nous avons rappelé les principales données concernant l'analyse conformationnelle des polypeptides en solution et résumé les théories du phénomène de transition hélice pelote. Par le choix de polypeptides à chaînes latérales diverses, soit "inerte" (alanine), soit "polaires" (méthionine, glutamate et aspartate de benzyle) et de composés modèles (amide secondaire et esters), nous avons montré que la transformation hélice - pelote en mélanges acide carboxylique - solvant organique est due à la formation de complexes par liaison hydrogène du type (I) :

$$\left[\text{-- NH} - \text{CHR} - \underset{\underset{O \ldots HOOCCF_3}{\|}}{C} - \right]_n$$

entre le squelette peptidique et l'acide. Cette interaction entre en compétition avec les liaisons hydrogène intramoléculaires de l'hélice et provoque ainsi la désorganisation des chaînes. Nous avons également montré qu'il n'y a pas protonation des groupements amide, ce qui nous paraît un résultat important compte tenu de la controverse à ce sujet et du rôle que certains auteurs font jouer à la protonation pour rendre compte, au moins qualitativement, de la transition. Cette première conclusion confirme l'hypothèse de base faite par les théoriciens qui ont proposé un modèle d'interaction polypeptide - solvant. Toutefois ces derniers envisagent parallèlement une complexation semblable à (I) entre groupes NH peptidiques et C=0 acide, complexation que nous n'avons pas mise en évidence et qui nous semble très improbable.

L'analyse plus précise de cette complexation de type (I) a ensuite été faite dans le but de localiser dans les chaînes les motifs amide susceptibles d'interagir avec l'acide. Pour cela nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus par les méthodes globales (dispersion optique rotatoire, viscosimétrie) et aux hypothèses de la théorie du phénomène de transition. Dans le cas de polymères assez polydispersés, on trouve, en première approximation, une assez bonne correspondance entre le taux de complexation mesuré par infrarouge et le pourcentage hélicoïdal ; mais la polydispersité des échantillons empêche d'approfondir cette relation. L'étude de polymères moins polydispersés montre par un dosage des fonctions amide complexées, que dès les premières additions d'acide à la solution de polymère dans le solvant hélicogène, il y a une association (I) assez importante sur environ 20 % des motifs peptidiques, qui se stabilise par la suite avant de croître très fortement comme prévu, au moment de la transition. Cette première complexation a été rapprochée de la diminution initiale de viscosité généralement observée dans les mêmes conditions d'acidité. La comparaison de ces deux résultats nous a suggéré que l'acide, en détruisant les agrégats formés entre chaînes en hélice, remplace les liaisons hydrogène peptidiques interchaînes par des liaisons chaîne - acide (I).

L'interprétation d'ensemble des spectres a pu se faire dans le cadre de la théorie du phénomène de transition. Ainsi nos résultats confirment l'hypothèse que seuls les résidus appartenant aux portions de chaînes désordonnées et aux extrémités de séquences en hélice sont capables de former des liaisons hydrogène avec l'acide. Toutefois, alors que les théoriciens utilisent le jeu de constantes d'association :

Chaîne principale

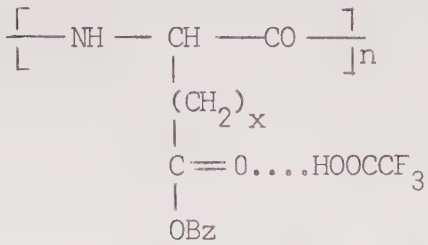
a) résidu des zones en hélice : $K_{CO} = K_{NH} = 0$

b) résidu des zones en pelote ou en bout d'hélice : $K_{CO} = K_{NH} = K$

notre étude montre que l'interaction essentielle est celle affectant les groupes carbonyle amide. Ceci nous conduit à proposer la modification de (b) :

$$K_{CO} = K_1, \; K_{NH} \simeq 0 (\text{ou} << K_1)$$

Notre analyse spectrale a aussi porté sur le comportement des chaînes latérales polaires au cours de la transformation de structure des polypeptides ; elles interagissent avec le milieu donneur de proton, comme la chaîne principale, en formant des complexes par liaison hydrogène mettant en jeu leur site basique, soit par exemple :



(III)

De plus, leur degré d'association est étroitement lié à la structure secondaire du polymère : le pouvoir accepteur de proton des chaînes latérales est plus accentué dans la conformation désordonnée du polypeptide que dans sa forme hélicoïdale. Cette différence semble aussi dépendre de la longueur de la chaîne latérale, ce qui peut être relié à sa conformation et donc aux interactions entre chaînes principale et latérales ou entre chaînes latérales. Le comportement des chaînes latérales polaires vis-à-vis du milieu complexant destabilisateur de l'hélice est, par conséquent, assez semblable à celui de la chaîne principale. Ceci n'avait pas été observé précédemment ni considéré dans la théorie de la transition induite par le milieu. Nos résultats suggèrent donc l'introduction d'une deuxième série de constantes de complexation dans le modèle théorique d'association polypeptide - solvant :

Chaîne latérale à site basique S

(c) zones hélicoïdales : $K_S = k_1$

(d) zones désordonnées : $K_S = k_2 > k_1$

Signalons enfin que nous avons étudié la conformation de ces polypeptides en présence d'un alcool (hexafluoroisopropanol). La plupart conservent leur structure en hélice même si dans un cas (poly - L - alanine) elle est déformée par interaction de l'alcool avec la chaîne peptidique. Toutefois nous avons pu mettre en évidence la transformation hélice - pelote du poly - L, β - aspartate de benzyle. C'est une transition "inversée" (exothermique) classique alors que si l'on remplace l'alcool fluoré par le m-crésol, la transition obtenue est "normale" (endothermique). Ce dernier point met en relief l'importance des grandeurs thermodynamiques caractérisant l'association polypeptide - donneur de proton sur l'allure de la transition thermique.

L'utilisation de la spectrométrie de vibration comme méthode d'étude des propriétés acido-basiques de polymères en solution permet donc d'aboutir à une meilleure connaissance de certains phénomènes structuraux dont ces polymères peuvent être le siège ; elle mérite d'être employée conjointement aux techniques globales.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

PRODUITS

Les échantillons d'amides mono - ou disubstitués sont soit des produits commerciaux, soit fournis par les laboratoires des Professeurs CHAMPETIER et NEEL. Les acétate et propionate de benzyle ont été synthétisés par PICARD, au laboratoire du Professeur CALAS.

Tous ces produits ont été distillés sous pression réduite avant leur utilisation et conservés sur tamis moléculaire Linde 4 Å.

Les chlorhydrates d'amide ont été synthétisés à partir des solutions d'amides dans l'éther éthylique sec par passage d'un courant d'acide chlorhydrique gazeux jusqu'à précipitation complète du sel formé. Le produit obtenu a été purifié par évaporation de l'éther sous pression réduite et sa stoéchiométrie 1 : 1 vérifiée par dosage du chlore.

Le polyacrylopipéridide a été fourni par les laboratoires des Professeurs CHAMPETIER et NEEL. La poly - L - alanine (échantillon B) et le poly - L , γ-glutamate de benzyle ($\overline{M}_W \simeq 75\ 000$) proviennent de la maison Miles. La poly - L - alanine (échantillon A) et le poly - DL, γ - glutamate de benzyle alterné ont été synthétisés au laboratoire de SPACH. La poly - L - méthionine provient du laboratoire du Professeur NEEL. Les échantillons de diverses masses de poly - L, γ - glutamate de benzyle et de poly - L, β - aspartate de benzyle nous ont été envoyés par MARCHAL. Ces polymères ont été généralement desséchés par chauffage prolongé sous vide.

Les solvants spectroscopiques employés (solvants inertes, alcools, halogénoformes, acides carboxyliques) sont des produits commerciaux qui ont été conservés sur tamis moléculaire. Les solvants très hygroscopiques comme les alcools, les acides etc... ont néammoins été distillés en présence de déshydratant.

SOLUTIONS ET CUVES D'ABSORPTION

Les concentrations d'amide ou de polymère utilisées pour les diverses solutions ont été généralement indiquées dans le texte. Elles sont comprises entre 0,05 et 0,5 mole/litre environ.

La conservation des produits, la préparation des solutions, et le remplissage des cellules ont toujours été faits sous atmosphère sèche dans un caisson étanche.

Les cuves d'absorption équipées de faces CaF_2 pour la plupart, avaient, lors des expériences d'ordre qualitatif, des épaisseurs généralement comprises entre 0,05 et 0,3 mm. Pour les déterminations quantitatives, l'épaisseur était de 1 mm (iode) et de 2 mm (phénols).

La cellule thermostatée que nous avons utilisée a été décrite par PINEAU (6). Celle ayant permis l'étude de l'influence de la température sur les valeurs de fréquence $\nu(C=O)$ des amides est du type FISHMAN (127).

APPAREILLAGE

Les spectres infrarouges ont été enregistrés avec des spectomètres Perkin - Elmer modèles 21 (équipé d'un prisme de fluorure de calcium), 112 (prisme de fluorure de lithium), 421, 521 et 225 (à réseaux) et Beckman type IR9 (à réseaux) fonctionnant en double faisceau pour les analyses qualitatives et le plus souvent en simple faisceau pour les mesures quantitatives. Le dessèchage des chemins optiques a été obtenu par une circulation d'air sec.

L'enregistrement des spectres étant réalisé sans compensation du faisceau de référence, chaque résultat est obtenu par comparaison de deux spectres consécutifs : l'un du solvant (ou mélange de solvants), l'autre du mélange amide - solvants. Sur les figures sont reproduites la plupart du temps les courbes obtenues par différence, (en densité optique), parfois on a reporté directement les deux spectres (en transmission).

Les mesures de dispersion rotatoire optique concernant la poly - L - alanine ont été faites par MARRAUD, laboratoire du Professeur NEEL, sur un spectropolarimètre de type FICA pour l'échantillon B et par HEITZ, laboratoire de SPACH, sur un appareil Perkin - Elmer modèle 141 M pour l'échantillon A. Les résultats des mesures ont été analysés en utilisant l'équation de MOFFIT (56, 57).

PRECISION DES MESURES

L'erreur commise sur la détermination des valeurs des fréquences est de l'ordre de ± 1 cm^{-1} pour les bandes les plus fines mais elle peut atteindre ± 4 cm^{-1} dans le cas des bandes les plus larges. Nous avons estimé les incertitudes sur les constantes de complexation à 10 % et sur les variations d'enthalpie ΔH° à 12 % environ. Les variations entropiques ΔS° sont connues à une unité près.

BIBLIOGRAPHIE

1) G.P. MIKHAILOV et A.L. SMOLYANSKII - Optics and Spectroscopy., 15, 254 et 416, (1963).

2) M.H. BARON, J. DE VILLEPIN, C. QUIVORON et M.L. JOSIEN - J. Chim. Phys., 67, 1752 et 1759, (1970).

3) R. FRIES - Thèse de Doctorat d'Etat, Paris (1965).

4) J. LASCOMBE - Thèse de Doctorat d'Etat, Bordeaux (1960).

5) P. COMBELAS, C. GARRIGOU-LAGRANGE et J. LASCOMBE - Ann. Chim., 5, 315, (1970).

6) P. PINEAU - Thèse de Doctorat d'Etat, Bordeaux (1961).

7) J. NEEL et B. SEBILLE - J. Chim. Phys., 58, 738, (1961).

8) J. NEEL, P. PINEAU et C. QUIVORON - J. Chim. Phys., 62, 37, (1965).

9) I.M. KLOTZ - J. Am. Chem. Soc., 68, 2299, (1966).

10) L.J. BELLAMY, H.E. HALLAM et R.L. WILLIAMS - Trans. Faraday Soc., 54, 1120, (1958).

11) M. HAURIE - Thèses de Doctorat, Bordeaux (1962) et (1966)

12) M. REY-LAFON, J. LASCOMBE et M.L. JOSIEN - Ann. Chim., 8, 493, (1963).

13) K.B. WHETSEL et R.E. KAGARISE - Spectrochim. Acta, 18, 315, (1962).

14) K.B. WHETSEL et R.E. KAGARISE - Spectrochim. Acta, 18, 329, (1962).

15) G.S. DENNISOV - Optics and Spectroscopy, 11, 232, (1961).

16) T. CAIRNS, G. EGLINGTON et D.T. GIBSON - Spectrochim. Acta, 20, 31, (1964).

17) F. CRUEGE - Thèse 3ème cycle, Bordeaux (1963).

18) T. GRAMSTAD - Acta Chem. Scand. 16, 807, (1962).

19) I.M. KLOTZ - Arch. Biochem. 9, 109, (1946).
I.M. KLOTZ - Protein interactions."The Proteins"(Edité par H. NEURATH et K. BAILEY), Vol. 1, Partie B, p.727. Academic Press (1953) ;
I.M. KLOTZ, F.M. WALKER et R.B. PIVAN - J. Am. Chem. Soc. 68, 1486, (1946).

20) R.S. DRAGO, R.L. CARLISON, N.J. ROSE et D.A. WENZ - J. Am. Chem. Soc., 83, 3572, (1961).
21) C.D. SCHMULBACH et R.S. DRAGO - J. Am. Chem. Soc., 82, 4484, (1960).
22) M.L. JOSIEN - J. Chim. Phys. 61, 245, (1964).
23) E.M. ARNETT - Progress in Phys. Org. Chem., Interscience Publishers, Vol. 1, 223, (1963).
24) A. BERGER, A. LOEWENSTEIN et S. MEIBOOM - J. Am. Chem. Soc., 81, 62, (1959).
25) T. BIRCHALL et R.J. GILLEPSIE - Can. J. Chem., 41, 2642, (1963).
26) C. FRANCONI, R. A. OGG et G. FRAENKEL - Colloque Ampère, 543 (1960).
27) G. FRAENKEL et C. FRANCONI - J. Am. Chem. Soc., 82, 4478, (1960).
28) A.R. KATRIZKY et R.A.Y. JONES - Chem. and Ind., 722, (1961).
29) R.J. GILLESPIE et T. BIRCHALL - Can. J. Chem., 41, 148, (1963).
30) R. STEWART et L.J. MUENSTER - Can. J. Chem. 39, 401, (1961).
31) R. STEWART, L.J. MUENSTER et J.T. EDWARD - Chem. and Ind., 1906, (1961).
32) D. COOK - Can. J. Chem., 42, 2721, (1964).
33) D. COOK - Can. J. Chem., 40, 2362, (1962).
34) W. KUTZELNIGG et R. MECKE - Spectrochim. Acta, 18, 549, (1962).
35) R.S. MULLIKEN - J. Phys. Chem., 56, 801, (1952).
36) A.I. SHATENSKTEIN - Isotopic Exchange and the remplacement of hydrogen, Consultant Bureau, New York, (1962).
37) C.L. BELL et G.M. BARROW - J. Chem. Phys., 31, 1158, (1959).
38) J. NASIELSKI et E. VAN DER DONCKT - Spectrochim. Acta, 19, 1989, (1963).
39) J.W. SMITH et M.C. VITORIA - J. Chem. Soc. (A), 2468, (1968).
40) R. SCOTT et S. VINOGRADOV - J. Phys. Chem., 73, 1890, (1969).
41) H. BABA, A. MATSUYAMA et H. KOKUBUN - Spectrochim. Acta, 25, 1709, (1969).
42) W.E. STEWART, L. MANDELKERN et R.E. GLICK - Biochem., 6, 143 et 150, (1967).
43) L.W. REEVES - Can. J. Chem., 39, 1711, (1961).
44) I.M. KLOTZ, S.F. RUSSO, S. HANLON et M.A. STAKE - J. Am. Chem. Soc., 86, 4774, (1964).
45) B. HOHMAN - Diss. Abstr., Univers. Microfilm (Ann Arbor Mich.) (Order n°64 13 466), 25, 8, 4425, (1965).
46) N. FUSON, M.L. JOSIEN, E.A. JONES et J.R. LAWSON - J. Chem. Phys., 20, 1627, (1952).
47) R.E. ROBINSON et R.C. TAYLOR - Spectrochim. Acta, 18, 1093, (1962).
48) C. DE LOZE, P. COMBELAS, P. BACELON et C. GARRIGOU-LAGRANGE - J. Chim. Phys., 69, 397, (1972).
49) P. COMBELAS - travaux non publiés.
50) S. IKEDA et G.D. FASMAN - J. Mol. Biol., 30, 491, (1967).
51) K. IKEDA, H. MAEDA et T. ISEMURA - J. Mol. Biol. 10, 223, (1964).

52) K. ROSENHECK et P. DOTY - Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 47, 1775, (1961).
53) I. YAHARA et K. IMAHORI - J. Am. Chem. Soc. 85, 230, (1963).
54) L. PAULING, R.B. COREY et H.R. BRANSON - Proc. Natl. Acad. Sci., (U.S.), 37, 205, 235, 241, (1951).
55) J.T. YANG - "Poly-α-amino acids" - Protein Models for Conformational Studies. G.D. FASMAN, ed. M. DEKKER, Inc (N. Y.), 1967, chapitre 6.
56) W. MOFFITT - J. Chem. Phys. 25, 467, (1956).
57) W. MOFFITT et J.T. YANG - Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 42, 596, (1956).
58) P. URNES et P. DOTY - Adv. in Protein Chem. 16, 401, (1961).
59) P. DOTY, A.M. HOLTZER, J.H. BRADBURY et E.R. BLOUT - J. Am. Chem. Soc., 76, 4493, (1954) et 78, 498, 947, (1956)
60) K. NAGAI - J. Chem. Phys., 34, 887, (1961).
61) T.M. BIRSHTEIN et O.B. PTITSYN - "Conformations of Macromolecules" High Polymers, Vol. 22, Interscience, Chap. 9, (1966).
62) B.H. ZIMM et J.K. BRAGG - J. Chem. Phys., 31, 526, (1959).
63) M. GŌ, N. GŌ et H. A. SCHERAGA - J. Chem. Phys., 52, 2060, (1970) et 54, 4489, (1971).
64) V.E. BYCHKOVA, O.B. PTITSYN et T.V. BARSKAYA - Biopolymers 10, 2161, 2181, (1971).
65) F.E. KARAZ et J.M. O'REILLY - Biopolymers, 4, 1015, (1966); 5, 27, (1967).
66) F.E. KARAZ et J.M. O'REILLY - Adv. in Chem. Series, 63, 180, (1967).
67) S. LIFSON et A. ROIG - J. Chem. Phys., 34, 1963, (1961).
68) J.A. SCHELLMAN - J. Phys. Chem. 62, 1485, (1958) et Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim., 29, 230, (1955).
69) L. PELLER - J. Phys. Chem., 63, 1194 et 1199, (1959).
70) J. H. GIBBS et E.A. Di MARZIO - J. Chem. Phys., 30, 271, (1959).
71) S. HANLON, S.F. RUSSO et I.M. KLOTZ - J. Am. Chem. Soc., 85, 2024, (1963).
72) S. HANLON et I.M. KLOTZ - Biochem., 4, 37, (1965).
73) S. HANLON - Biochem., 5, 2049, (1966).
74) S. HANLON et I.M. KLOTZ - Developments in Appl. Spectros., 6, 219, (1968).
75) B.Z. VOLCHEK et A.V. PURKINA - Vysokomol.Soyed. A9, 1257, (1967) et A11, 1563, (1969).
76) J.W.O. TAM et I.M. KLOTZ - J. Am. Chem. Soc., 93, 1313, (1971).
77) J.H. BRADBURY et M.D. FENN - Aust. J. Chem., 22, 357, (1969).
78) J.H. BRADBURY et B.E. CHAPMAN - J. Macromol. Sci. Chem., A4, 1137, (1970).
79) J.H. BRADBURY et M.D. FENN - J. Mol. Biol, 36, 231, (1968).
80) J.H. BRADBURY et H.H.H. YUAN - Biopolymers, 11, 661, (1972).

81) J.C. HAYLOCK et H.M. RYDON - Colloq. Int. Centre. Nat. Rech. Sci., 175, 19, (1968).

82) M.A. STAKE et I.M. KLOTZ - Biochem., 5, 1726, (1966).

83) H. WATANABE, K. YOSHIOKA et A. WADA - Biopolymers, 2, 91, (1964) et 4, 43, (1966).

84) A. TAKAHASHI, L. MANDELKERN et R.E. GLICK - Biochem., 8, 1673, (1969).

85) E.M. BRADBURY et H.W.E. RATTLE - Polymer, 9, 201,(1968).

86) F.A. BOVEY - Pure and Appl. Chem., 16, 417, (1968).

87) D. BALASUBRAMANIAN - Biochem. Biophys. Res. Comm., 29, 538, (1967).

88) F. QUADRIFOGLIO et D.W. URRY - J. Phys. Chem., 71, 2364, (1967).

89) J.A. FERRETTI et L. PAOLILLO - Biopolymers, 7, 155, (1969).

90) I.M. KLOTZ, S.F. RUSSO, S. HANLON et M.A. STAKE - J. Am. Chem. Soc., 86, 4774, (1964).

91) C. LAPP et J. MARCHAL - J. Chim. Phys., 1032, (1965).

92) T. IIO et S. TAKAHASHI - Bull. Chem. Soc., Japan, 43, 515, (1970).

93) J.B. MILSTIEN et E. CHARNEY - Biopolymers, 9, 991, (1970).

94) A. WARASHINA, T. IIO et T. ISEMURA - Biopolymers, 9, 1445, (1970).

95) G.D. FASMAN - "Poly-α-amino acids" G.D. FASMAN,ed. M. DEKKER N.Y. Inc. p.514 (1967).

96) D.N. SILVERMAN et H.A. SCHERAGA - Biochem. 10, 1340, (1971).

97) F.A. BOVEY, J.P. RYAN, G. SPACH et F. HEITZ - Macromolecules, 4, 433, (1971).

98) F. HEITZ et G. SPACH - Macromolecules, 4, 429, (1971).

99) A.R. GOLDFARB, A. MELE et N. GUTSTEIN - J. Am. Chem. Soc. 77, 6194, (1955).

100) A.R. GOLDFARB, E. HOFFMANN et N. GUTSTEIN - Arch. Biochem. Biophys. 76, 161, (1958).

101) M. LILER - J. Chem. Soc. B, 4, 385, (1969).

102) M. KIRSZENBAUM - Thèse 3ème cycle, Paris (1971).

103) C.G. CANNON - Mikrochimica Acta, 2, 555, (1955).

104) P. COMBELAS, F. CRUEGE, J. LASCOMBE, C. QUIVORON et M. REY-LAFON - J. Chim. Phys., 66, 668, (1969).

105) P. COMBELAS, F. CRUEGE, J. LASCOMBE, C. QUIVORON, M. REY-LAFON et B. SEBILLE - Spectrochim. Acta, 26A, 1323, (1970).

106) G.D. FASMAN "Polyamino acids, Polypeptides and Proteins" (M.A. STAHMANN ed.) Univ. Wisconsin Press, Madison p.221, (1962).

107) J.S. FRANZEN, C. BOBIK et J.B. HARRY - Biopolymers, 4, 637, (1966).

108) F.A. BOVEY - "High resolution NMR of macromolecules" Academic Press Inc. N. Y. p.293, (1972).

109) R.D.B. FRASER, B.S. HARRAP, R. LADGER, T.P. MACRAE, F.H.C. STEWART et E. SUSUKI - Biopolymers, 5, 797, (1967).

110) S.M. BLOOM, G.D. FASMAN, C. DE LOZE et E.R. BLOUT - J. Am. Chem. Soc., 84, 458, (1962).

111) F. HEITZ (communication privée)

112) E.M. BRADBURY, A.R. DOWNIE, A. ELLIOTT et W.E. HANBY - Proc. Roy. Soc. (London), A259, 110, (1960).

113) J.B. ARAGO et M.H. LOUCHEUX - J. Chim. Phys., 68, 1578, (1971).

114) P. DOTY - Collection Czech. Chem. Commun., 22, 5, 11, (1957).

115) P. DOTY et J.T. YANG - J. Am. Chem. Soc., 78, 498, (1956).

116) E. MARCHAL - Thèse de Doctorat d'Etat, Strasbourg, (1964).

117) T. GRAMSTAD - Spectrochim. Acta,19, 497, (1963).

118) D.N. SILVERMAN, G.T. TAYLOR et H.A. SCHERAGA - Arch. Biochem. Biophys., 146, 587, (1971).

119) E.M. BRADBURY, B.G. CARPENTER, C. CRANE-ROBINSON et H. GOLDMAN - Nature London, 225, 64, (1970).

120) G. GOVIL - J. Ind. Chem. Soc., 48, 731, (1971).

121) J.F. YAN, F.A. MOMANY et H.A. SCHERAGA - J. Am. Chem. Soc., 92, 1109, (1970).

122) T. OOI, R.A. SCOTT, G. VANDERKOOI et H.A. SCHERAGA - J. Chem. Phys., 46, 4410, (1967).

123) M. BIXON et S. LIFSON - Biopolymers, 4, 815, (1966).

124) J.R. PARRISH et E.R BLOUT - Biopolymers, 10, 1491, (1971).

125) J.R. PARRISH et E.R. BLOUT - Biopolymers, 11, 1001, (1972).

126) Y. HAYASHI, A. TERAMOTO, K. KAWAHARA et H. FUJITA - Biopolymers, 8, 403, (1969).

127) E. FISHMAN - Appl. Opt. 1, 493,(1962).

Vu et approuvé
Bordeaux le
Le Président de l'Université
de Bordeaux I

Centre de Recherche Paul PASCAL
Service Reprographique
Domaine Universitaire
33405 TALENCE